

明 細 書

細胞外基質沈着タンパク質

5 技術分野

本発明は、内皮細胞遺伝子座-1(Del-1)タンパク質の部分断片である細胞外基質沈着タンパク質に関する。また、本発明は、上記部分断片を用いた細胞外基質沈着部位の同定方法、及び、Del-1 タンパク質と融合した目的分子（例えば、アルカリホスファターゼ）回収方法に関する。

10

背景技術

Del-1(developmentally endothelial locus-1)タンパク質（単に「Del-1」、「全長 Del-1」ともいう）は、EGF（上皮増殖因子、epithelial growth factor）類似のドメイン及びジスコイジン I 類似ドメインを有するタンパク質である。このタンパク質は細胞外基質タンパク質であり、血管内皮細胞表面の $\alpha_v\beta_3$ インテグリン受容体あるいは $\alpha_v\beta_5$ インテグリン受容体と呼ばれるタンパク質と EGF 類似ドメインを介して結合し、内皮細胞の細胞外基質への接着を促進することが知られている(Hidai, C. et al., GENES & DEVELOPMENT 12: 21-33, 1998)。

近年、全長 Del-1 をコードする遺伝子がクローニングされた。全長 Del-1 はその一部あるいは全部を介して細胞外基質中のプロテオグリカンと結合することができると推察されている。そこで、全長 Del-1 を発現させて所定の分子（タンパク質、プロテオグリカン等）を全長 Del-1 に結合させ、全長 Del-1 に結合した分子（タンパク質、プロテオグリカン等）を回収する方法が知られている（例えば特表平 11-507527 号公報を参照）。

25 従って、これらの結合部位を特定し結合様式を解析することは、目的分子の回収、及び全長 Del-1 に結合する分子の研究解析のために重要である。

しかしながら、全長 Del-1 の細胞外基質沈着能はそれほど高くないため、当該全長 Del-1 に結合した目的分子を十分に回収することができなかった。

発明の開示

本発明は、細胞外基質に効率良く接着することができる領域を含む Del-1 の部分断片を提供することを目的とする。

- 5 本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、ジスコイジン I 類似ドメイン付近の領域が効率的に細胞外基質に沈着することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

- 10 (1) 以下の (a)又は(b)のタンパク質。

- (a) 配列番号 1 8 若しくは 2 4 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質
(b) 配列番号 1 8 若しくは 2 4 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、細胞外基質への沈着活性を有するタンパク質

- 15 (2) 以下の (a)又は(b)のタンパク質。

- (a) 配列番号 6、8、10、12、18 若しくは 2 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

- (b) 配列番号 6、8、10、12 18 若しくは 2 4 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列

- 20 からなり、かつ、細胞外基質への沈着活性を有するタンパク質

- (3) 以下の (a)又は(b)のタンパク質。

- (a) 配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質

- (b) 配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、細胞外基質への沈

- 25 着を抑制する活性を有するタンパク質

- (4) 以下の (a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

- (a) 配列番号 1 8 若しくは 2 4 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質

- (b) 配列番号 1 8 若しくは 2 4 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個

のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、細胞外基質への沈着活性を有するタンパク質

(5) 以下の (a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

(a)配列番号 6、8、10、12、18若しくは24に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 6、8、10、12、18若しくは24に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、細胞外基質への沈着活性を有するタンパク質

(6) 以下の (a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

(a) 配列番号 14に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号 14に示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、細胞外基質への沈着を抑制する活性を有するタンパク質

(7) 以下の(a)又は(b)の DNA を含む遺伝子。

(a) 配列番号 17若しくは23に示される塩基配列を含む DNA

(b) 配列番号 17若しくは23に示される塩基配列からなる DNA に対し相補的な塩基配列を含む DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、細胞外基質への沈着活性を有するタンパク質をコードする DNA

(8) 以下の(a)又は(b)の DNA を含む遺伝子。

(a) 配列番号 5、7、9、11、17若しくは23に示される塩基配列からなる DNA

(b) 配列番号 5、7、9、11、17若しくは23に示される塩基配列からなる DNA に対し相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、細胞外基質への沈着活性を有するタンパク質をコードする DNA

(9) 以下の(a)又は(b)の DNA を含む遺伝子。

(a) 配列番号 13に示される塩基配列を含む DNA

(b) 配列番号 13に示される塩基配列からなる DNA に対し相補的な塩基配列を

含む DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、細胞外基質への沈着を抑制する活性を有するタンパク質をコードする DNA

(10)(4)～(9)のいずれか1項に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

(11)(10) 記載の組換えベクターを含む形質転換体。

5 (12)(11) 記載の形質転換体を培養し、得られる培養物から Del-1 タンパク質の部分断片を採取することを特徴とする Del-1 部分断片の製造方法。

(13)(1)～(3)のいずれか1項に記載のタンパク質と細胞外基質とを反応させることにより、前記タンパク質が前記細胞外基質に沈着する部位を同定する方法。

10 (14)(1)～(3)のいずれか1項に記載のタンパク質を含む、細胞外基質沈着部位同定用試薬。

(15)(1)～(3)のいずれか1項に記載のタンパク質と発現の目的分子とが連結した融合タンパク質。

(16)(15) 記載の融合タンパク質を含有する薬物送達システム。

15 (17)(4)～(9)のいずれか1項に記載の遺伝子と、発現の目的分子をコードする遺伝子とが連結された、融合タンパク質をコードする遺伝子。

(18)(17) 記載の遺伝子を含む組換えベクター。

(19)(18) 記載の組換えベクターを含む形質転換体。

20 (20)(19) 記載の形質転換体を培養し、得られる培養物から Del-1 タンパク質の部分断片と発現の目的分子との融合タンパク質を採取することを特徴とする該融合タンパク質の製造方法。

(21)(15) 記載の融合タンパク質を細胞外基質に沈着させ、目的分子を採取することを特徴とする目的分子の回収方法。

(22) 目的分子を沈着させる方法であって、以下の工程：

25 (a) (19) 記載の形質転換体を培養することによって、発現の目的分子と Del-1 タンパク質の部分断片との融合タンパク質を生産させる工程、及び
(b) 前記融合タンパク質を細胞外基質に沈着させる工程
を含む前記方法。

(23) 目的分子を回収する方法であって、以下の工程：

(a) (19) 記載の形質転換体を培養することによって、発現の目的分子と Del-1 タンパク質の部分断片との融合タンパク質を生産させる工程、

(b) 前記融合タンパク質を細胞外基質に沈着させる工程、及び

5 (c) 前記融合タンパク質から目的タンパク質を切断することによって、前記目的分子を採取する工程
を含む前記方法。

10 (24) 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列のうち、活性中心領域と陽性調節領域とを含む断片、及び/又は活性中心領域と陰性調節領域とを含む断片を細胞外基質と反応させることを特徴とする、細胞外基質への沈着活性を調節する方法。

(25) 活性中心領域のアミノ酸配列が配列番号 4 に示されるものである (24) 記載の方法。

(26) 陽性調節領域のアミノ酸配列が配列番号 20 に示されるものである (24) 記載の方法。

15 (27) 陰性調節領域のアミノ酸配列が配列番号 22 に示されるものである (24) 記載の方法。

本発明により、Del-1 部分断片が提供される。Del-1 部分断片の発現タンパク質は細胞外基質への沈着活性を有することから、Del-1 部分断片を用いることによって、
20 Del-1 部分断片の発現タンパク質と結合した目的分子を細胞外基質に効率的に沈着させることができる。また当該沈着によって、目的分子を回収または除去することができる。

Del-1 部分断片を用いて目的分子を細胞外基質上に沈着させることによって、当該目的分子を標的組織で濃縮、限局することができる。特に、当該目的分子を血漿
25 への流出を防ぐことによって、他の組織への移行を防止できる。

また、本発明の Del-1 部分断片の中には、細胞外基質への沈着を抑制する機能を有する蛋白を発現する断片も含まれている。従って、沈着活性を有する断片と細胞外基質への沈着を抑制する断片とを組み合わせることで沈着活性を増減することによって、

目的分子の回収、除去、濃縮等を制御することができる。

図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の Del-1 部分断片の塩基配列の概略と、各部分断片のアルカリホスファターゼ活性による沈着活性測定結果を示す図である。

図 2 は、本発明の Del-1 部分断片の細胞外基質への結合活性を示す図である。

図 3 は、各肝臓から採取した血漿中の AP/Lac 比を示す図である。

図 4 は、各肝臓から採取した肝組織中の AP/Lac 比を示す図である。

図 5 は、各肝臓から採取した肝組織のアルカリホスファターゼ染色結果を示す図である。

図 6 は、ウェスタンブロットを示す図である。

図 7 は、アルカリホスファターゼの回収結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

15 本発明は、細胞外基質に特異的に結合する領域を含む全長 Del-1 タンパク質の部分断片、すなわち Del-1 沈着蛋白及び Del-1 沈着抑制蛋白（単に、「Del-1 部分断片」ともいう）に関するものである。本発明の Del-1 部分断片は、全長 Del-1 を種々の長さに切断することにより作製されたものであり、細胞外基質への沈着活性を有することを特徴とする。

20 本発明の Del-1 部分断片は、全長 Del-1 遺伝子（配列番号 1）の配列のうち、少なくとも 1270～1662 番の塩基配列の領域によりコードされるアミノ酸（配列番号 2 に示すアミノ酸配列の 218～348 番のアミノ酸配列）を含むものである。この領域の塩基配列を配列番号 3 に、これによりコードされるアミノ酸配列を配列番号 4 に示す。また、上記領域を含む本発明の Del-1 部分断片は、配列番号 5、7、9、
25 11、13、15 又は 17 に示す塩基配列を有するものであり、これらの塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を、それぞれ配列番号 6、8、10、12、14、16 又は 18 に示す。

上記 Del-1 部分断片は、それをコードするアミノ酸配列から、プロテオグリカン

と結合することができると推察されている。

全長 Del-1 タンパク質または Del-1 部分断片の検出には、アルカリホスファターゼを用いた検出法が採用されている。すなわち、遺伝子組み換えにより全長 Del-1 タンパク質の N 末端にアルカリホスファターゼを融合したタンパク質を細胞に発現させることによって、培養上清にも細胞外基質と同様にアルカリホスファターゼ活性を確認することができる。

また、本発明においては、上記アルカリホスファターゼを用いた検出法のほか、Del-1 部分断片等の検出にウェスタンブロット法を用いることもできる。具体的には、アルカリホスファターゼと全長 Del-1 または Del-1 部分断片とを融合したタンパク質をコードする塩基配列を cos7 細胞に導入し、一定時間培養後に培養液と細胞外基質を採取してウェスタンブロットを行うことによって検出できる。コントロールとしては例えばラミニンとアルブミンを用いることができる。なお、ウェスタンブロット法において、培養上清中の Del-1 タンパク質または Del-1 部分断片の検出の感度を向上させるために、使用する培養液を増量し、タンパク質を濃縮してもよい。

上記検出法はどちらを採用することもできるが、アルカリホスファターゼを用いた検出法が好ましい。

本発明においては、既知の全長 Del-1 を種々の方法によって切断することによって得られた本発明の Del-1 部分断片を作製し、当該 Del-1 部分断片をアルカリホスファターゼを用いた前記検出方法およびウェスタンブロット法による細胞外基質沈着能を調べた。また、Del-1 部分断片の細胞外基質への沈着部位の同定、及び生体内特定部位への Del-1 部分断片の固定を行なった。さらに、Del-1 部分断片を用いた目的遺伝子の発現産物の回収を行った。

以下、本発明の実施の形態について具体的に説明する。

1. Del-1 部分断片をコードする DNA

Del-1 部分断片は、全長 Del-1 をコードする DNA を種々の長さに切断し、これを発現させることにより得ることができる。

全長 Del-1 遺伝子のクローニングは、公知手法に従って行うことができる (Hidai C. et al., GENES & DEVELOPMENT, 12:21-33, 1998)。すなわち、ゲノムライブラリーからエクソントラッピングによりエクソンを得、これを用いて cDNA をクローニングすることができる。

- 5 例えば、ゲノムクロンの断片をスプライシングベクターに挿入し、mRNA の転写の際にスプライシングを起こさせる。次に、スプライスした mRNA を逆転写及び増幅し、エクソンのシーケンスを行う。

- 得られたエクソンは、cDNA ライブラリーから目的 DNA を釣り上げるためのプローブとして用いるか、あるいは 5'-RACE、3'-RACE のための遺伝子特異的プライマー
10 マーの設計に用いられる。なお、RACE 法を行うには、市販のキット（例えば、Marathon™ cDNA Amplification Kit、Clontech 社）を用いることができる。

cDNA の塩基配列の決定は、公知の任意の手法により行うことができるが、通常は自動塩基配列決定装置を用いて配列決定が行われる。

- このようにして得られた全長 cDNA の塩基配列を配列番号 1 に示す。また、配列
15 番号 1 に示す塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。

- 本発明の切断型 Del-1 部分断片の 1 つは、配列番号 2 に示すアミノ酸配列のうち
1 ~ 348 番目のアミノ酸配列を含むものである。上記部分断片は、配列番号 1 に示す塩基配列を有する DNA を Exonuclease III と Mung bean nuclease を用いて 3' 末端から順次削除することにより得ることができる。削除される 3' 末端の DNA は
20 Exonuclease III の反応時間により決定される。この方法は市販の酵素（例えば Exonuclease III：タカラバイオ社製）を用いることができる。

全長 Del-1 (Del-1 major)、本発明の切断型 Del-1 部分断片および当該部分断片の沈着活性に影響を与えるアミノ酸配列の模式図を図 1 の左側上部に示す。

- 図 1 において、CY は配列番号 2 に示すアミノ酸配列のうち 218 ~ 348 番（配列番
25 号 4）、4-1 は 1 ~ 348 番（配列番号 6）、4-14 は 1 ~ 368 番（配列番号 10）、4-13 は 1 ~ 385 番（配列番号 12）、CB は 218 ~ 480 番（配列番号 14）、XY は 123 ~ 348 番（配列番号 18）の領域のアミノ酸配列を有する。

これらの Del-1 部分断片をコードする DNA（「本発明の DNA」という）は、CY

については、配列番号 1 に示す塩基配列の 1270～1662 番 (393bp, 配列番号 3)、
4-1 については 619～1662 番 (1044bp, 配列番号 5)、4-14 については 619～1722
番 (1104bp, 配列番号 9)、4-13 については 619～1773 番 (1155bp, 配列番号 11)、
CB については 1270～2058 (789bp, 配列番号 13)、XY については、985～1662
5 (678bp, 配列番号 17) の領域の塩基配列を有する。

また、ヒトの全長 Del-1 においても、マウス断片 XY (配列番号 18) に対応する
human XY (配列番号 24) の沈着活性を測定した。human XY をコードする DNA
は、配列番号 23 の塩基配列を有する。

図 1 には示されていないが、本発明の切断型上記 Del-1 部分断片として、4-15 は
10 配列番号 2 に示すアミノ酸配列のうち 1～365 番 (配列番号 8)、DE は 218～319
番 (配列番号 16) の領域のアミノ酸配列を有する。これらのアミノ酸配列をコード
する DNA は、4-15 については、配列番号 1 に示す塩基配列の 619～1713 番 (1095bp,
配列番号 7)、DE については 1270～1575 (306bp, 配列番号 15) の領域のアミノ
酸配列を有する。

15 また、図 1 において、本発明の Del-1 部分断片の沈着活性を向上又は低減させる
アミノ酸配列として、XC は 123～217 番 (配列番号 20)、YB は 349～480 (配列
番号 22) の領域のアミノ酸配列を有する。また、これらのアミノ酸配列をコード
する DNA は、XC については 985～1269 (285bp, 配列番号 19)、YB について
は 1663～2058 (396bp, 配列番号 21) の領域の塩基配列を有する。

20 さらに、本発明の部分断片は、上記配列番号 2 に示すアミノ酸配列の少なくとも
218～348 番のアミノ酸配列 (配列番号 4) に示す CY を含むものである。また、本
発明の部分断片は、上記配列番号 2 に示すアミノ酸配列の少なくとも 218～348 番
のアミノ酸配列 (配列番号 4) を複数連結したタンパク質を含むものである。これ
らの領域は、細胞外基質への沈着活性を有する中心領域である。上記 CY は、配列
25 番号 1 に示す塩基配列の 1270～1662 番の領域 (配列番号 3) によりコードされる。

また、配列番号 20 に示すアミノ酸配列 (XC) は細胞外基質への沈着活性を向上
させるものであり、当該沈着活性の陽性調節領域である。他方、配列番号 22 に示
すアミノ酸配列 (YB) は細胞外基質への沈着活性を低減させるものであり、当該沈

着活性の陰性調節領域である。「陽性調節領域」とは、その領域だけでは沈着活性を生じないが、中心領域 CY が含まれることにより沈着活性を引き起こすことができる領域を意味する。「陰性調節領域」とは、その全部又は一部の存在により、中心領域 CY や陽性調節領域 XC の存在にかかわらず、沈着活性が低下して、可溶性分画が増加する断片の領域を意味する。

5 本発明の Del-1 部分断片（マウス及びヒト由来）の領域をまとめると表 1 の通りである。

表 1

名称	領域*		種類	配列番号
全長 Del-1			DNA	1
全長 Del-1	619-2061		タンパク質	2
CY	1270-1662	中心領域	DNA	3
CY	218-348	中心領域	タンパク質	4
4-1	619-1662	中心＋陽性調節領域を含む	DNA	5
4-1	1-348	中心＋陽性調節領域を含む	タンパク質	6
4-15	619-1713	中心＋陽性調節領域を含む	DNA	7
4-15	1-365	中心＋陽性調節領域を含む	タンパク質	8
4-14	619-1722	中心＋陽性調節領域を含む	DNA	9
4-14	1-368	中心＋陽性調節領域を含む	タンパク質	10
4-13	619-1773	中心＋陽性調節領域を含む	DNA	11
4-13	1-385	中心＋陽性調節領域を含む	タンパク質	12
CB	1270-2058	中心＋陰性調節領域	DNA	13
CB	218-480	中心＋陰性調節領域	タンパク質	14
DE	1270-1575		DNA	15
DE	218-319		タンパク質	16
XY	985-1662	中心＋陽性調節領域	DNA	17
XY	123-348	中心＋陽性調節領域	タンパク質	18
XC	985-1269	陽性調節領域	DNA	19
XC	123-217	陽性調節領域	タンパク質	20
YB	1663-2058	陰性調節領域	DNA	21
YB	349-480	陰性調節領域	タンパク質	22
human XY		中心＋陽性調節領域	DNA	23
human XY		中心＋陽性調節領域	タンパク質	24

* 領域は、DNA のときは塩基番号、タンパク質のときはアミノ酸番号で示す。

一度部分断片の領域が決定されると、その後は、当該領域を増幅させるようにプライマーを設計し、Del-1 をコードする DNA を鋳型として PCR を行うことにより、容易に部分断片をコードする DNA を得ることができる。

ここで、本発明においては、上記 Del-1 部分断片のアミノ酸配列からなるタンパク質が細胞外基質との沈着活性を有する限り、当該アミノ酸配列において少なくとも 1 個、好ましくは 1 個又は数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じて

もよい。

例えば、配列番号 6、8、10、12、18 又は 24 に示すアミノ酸配列の 1 個又は数個、例えば 1～10 個、好ましくは 1～5 個のアミノ酸が欠失してもよく、配列番号 6、8、10、12、18 又は 24 に示すアミノ酸配列に、1 個又は数個、例えば 1～10 個、好ましくは 1～5 個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号 6、8、10、12、18 又は 24 に示すアミノ酸配列の 1 個又は数個、例えば 1～10 個、好ましくは 1～5 個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよい。従って、上記変異が導入されたアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする遺伝子も、当該タンパク質が細胞外基質への沈着活性を有する限り本発明の遺伝子に含まれる。

また、本発明においては、上記 Del-1 部分断片のアミノ酸配列からなるタンパク質が細胞外基質への沈着を抑制する機能を有する限り、当該アミノ酸配列において少なくとも 1 個、好ましくは 1 個又は数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じて

もよい。

例えば、CB 領域である配列番号 14 に示すアミノ酸配列の 1 個又は数個、例えば 1～10 個、好ましくは 1～5 個のアミノ酸が欠失してもよく、配列番号 14 に示すアミノ酸配列に、1 個又は数個、例えば 1～10 個、好ましくは 1～5 個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号 14 に示すアミノ酸配列の 1 個又は数個、例えば 1～10 個、好ましくは 1～5 個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよい。従って、上記変異が導入されたアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする遺伝子も、当該タンパク質が細胞外基質への沈着を抑制する活性を有する限り本発明の遺伝子に含まれる。

上記欠失、置換、付加等の変異の導入は、部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット、例えば GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System（インビトロジェン社）、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System（Mutan-K、Mutan-Super Express Km 等：タカラバイオ社製）を用いて行うことができる。

- 5 さらに、本発明においては、上記 Del-1 部分断片をコードする DNA（配列番号 5、7、9、11、17 又は 23）に対し相補的な塩基配列からなる DNA と、ストリンジントな条件下でハイブリダイズすることができる DNA であって細胞外基質に対し結合活性を有するタンパク質をコードする DNA も本発明の遺伝子に含まれる。ストリンジントな条件とは、例えば、塩（ナトリウム）濃度が 150～900mM
10 であり、温度が 55～75℃、好ましくは塩（ナトリウム）濃度が 150～200mM であり、温度が 60～70℃での条件をいう。

- さらに、本発明においては、Del-1 部分断片をコードする DNA（配列番号 13 に示す）に対し相補的な塩基配列からなる DNA と、ストリンジントな条件下でハイブリダイズすることができる DNA であって細胞外基質への沈着を抑制する活性
15 を有するタンパク質をコードする DNA も本発明の遺伝子に含まれる。

- ここで、「細胞外基質」(ECM) とは、動物組織中の細胞外に存在する生体構造物であって、細胞内で合成され細胞外に分泌・蓄積した生体高分子の会合体を意味する。主要な構成成分はコラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン、グリコサミノ
20 グリカン、糖タンパク質である。「沈着活性」とは、Del-1 の全部又は一部の領域が細胞外基質に結合する活性を意味し、例えば全長 Del-1 よりも沈着活性が高いもの、全長 Del-1 よりも沈着活性が低いもの、あるいは全長 Del-1 より短いが沈着活性が同等であるものも含まれる。細胞外基質への沈着を抑制する活性とは、陰性調節領域の存在により、中心領域 CY や陽性調節領域 XC の存在にかかわらず、沈着活性
25 が低下して、可溶性分画が増加する活性を意味する。沈着活性又は細胞外基質への沈着を抑制する活性の測定は、例えば以下の通り行われる。

本発明の DNA にアルカリホスファターゼなどのマーカーをコードする DNA を連結し、これを所定の細胞（例えば cos7 細胞、CHO 細胞、NIH3T3 細胞等）に導

入して培養する。培養容器からその培養上清及び細胞を除去した後、培養容器に残った細胞外基質にアルカリホスファターゼの基質を加えて発色させ、沈着活性を測定する。Del-1 部分断片にはマーカー（アルカリホスファターゼ）も結合しているため、Del-1 部分断片が細胞外基質に沈着すると、マーカーを指標として結合活性を測定することができる。5
また、結合位置を同定することができる。例えば、可溶性アルカリホスファターゼ基質を用いると、基質が発色（例えば、黄色等に発色）するため、特異的な波長での吸光度を測定することで容易に沈着活性を測定することができる。また、沈着性アルカリホスファターゼを用いると、沈着部位が発色（例えば、紫等）するため、顕微鏡観察等によりその沈着部位を容易に同定することができる。10

なお、マーカーはアルカリホスファターゼに限定されるものではなく、その他 GFP とその変異型、myc や His などの tag、GST 蛋白、アイソトープ、ビオチン化蛋白などを用いることができる。また、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、 β ガラクトシダーゼなどのレポーター遺伝子を用いてアッセイすることも可能である。15

2. 本発明の DNA を含む組換えベクター及び形質転換体の作製

(1) DNA を含む組換えベクターの作製

本発明の DNA を含む組換えベクターは、適当なベクターに本発明の DNA を連結(挿入)することにより得ることができる。本発明の DNA を挿入するためのベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミド DNA、ファージ DNA、ウイルス等が挙げられる。20

プラスミド DNA としては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミドなどが挙げられ、ファージ DNA としては入ファージ等が挙げられる。またウイルスとしてはアデノウイルスやレトロウイルスなどが挙げられる。25

本発明のベクターには、プロモーター、本発明の DNA のほか、所望によりエンハンサーなどのシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリ A 付加シグナル、

選択マーカー、リボソーム結合配列（SD 配列）などを連結することができる。なお、選択マーカーとしては、例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

5 (2)形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、本発明の組換えベクターを、目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。ここで、宿主としては、本発明の DNA を発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、当分野において周知の細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞を用いることができる。また、
10 マウスなどの実験動物やブタなどの家畜、イネ、トウモロコシなどの植物を用いることができる。

細菌を宿主とする場合は、本発明の組換えベクターが該細菌中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明の DNA、転写終結配列を含めることができる。細菌としては、大腸菌(*Escherichia coli*)、枯草菌
15 (*Bacillus subtilis*)などが挙げられる。プロモーターとしては、例えば trp プロモーター、lac プロモーター、PL プロモーター、PR プロモーターなどが用いられる。細菌への組換えベクターの導入方法は特に限定されるものではなく、例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

酵母を宿主とする場合は、例えばサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)などが用
20 いられる。この場合、プロモーターとしては酵母中で発現できるものであれば特に限定されず、例えば gal1 プロモーター、gal10 プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MF α 1 プロモーター、PHO5 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター等が挙げられる。酵母への組換えベ
25 クターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等が挙げられる。

動物細胞を宿主とする場合は、サル細胞（cos7 細胞）、Vero、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO 細胞）、マウス L 細胞、ラット GH3 細胞、又はヒト FL、

HEK293 細胞などが用いられる。プロモーターとしては、SR α プロモーター、SV40 プロモーター、LTR プロモーター、 β -アクチンプロモーター等が挙げられる。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

- 5 昆虫細胞を宿主とする場合は、Sf9 細胞、Sf21 細胞などが用いられる。昆虫細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法などが用いられる。

また、動物、植物に対する遺伝子導入にはウィルスベクターを用いる方法や、リポフェクション法などがある。また生殖細胞や ES 細胞に対して遺伝子を導入し、

- 10 遺伝子組み換え動物を作製することも可能である。

3. 本発明の Del-1 部分断片の生産

本発明の Del-1 部分断片は、前記形質転換体を培養あるいは飼育し、その培養物あるいは飼育産物から採取することにより得ることができる。「培養物」とは、培養上清、培養細胞、培養菌体、又は細胞若しくは菌体の破碎物のいずれをも意味するものである。「飼育産物」とは動物、植物の本体、組織、分泌物、排泄物およびそれらの加工品のいずれをも意味するものである。

本発明の形質転換体を培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

- 20 細菌や酵母等を宿主とする形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行うことができる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類

25 が用いられる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー等が用いられる。

無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

5 培養は、通常、振盪培養又は通気攪拌培養などの好氣的条件下、例えば 37℃で 12～24 時間行う。pH の調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、Lac プロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトシド(IPTG)等を培地に添加してもよい。

10 動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されている RPMI-1640 培地、DMEM 培地又はこれらの培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。

培養は、通常、5 % CO₂ 存在下、37℃で 1～4 日行う。培養中は必要に応じてカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

15 培養後、本発明のタンパク質が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破碎することによりタンパク質を抽出する。また、タンパク質が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換
20 クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせることで、前記培養物中から本発明の Del-1 部分断片を単離精製することができる。

動物（マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウシ等の実験動物又は家畜）、あるいは植物が形質変換体として用いられる場合、それらは通常の飼育、栽培方法以外に、無
25 菌環境や特殊飼料など特殊な飼育培養方法を必要とする可能性もある。形質転換体が上記動物の場合、肉、卵、毛、母乳、尿、糞便などから、一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせて用い

ることにより、本発明の Del-1 部分断片を単離精製することができる。

また形質転換体が植物の場合、葉、花、実、根などのほか、栽培に用いた土や水などから、一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせることで用いることにより、本発明の Del-1 部分断片を単離精製することができる。

本発明においては、*in vitro* 翻訳による Del-1 部分断片の合成を採用することができる。この場合は、RNA を鋳型にする方法と DNA を鋳型にする方法（転写／翻訳）の 2 通りの方法を用いることができる。鋳型 DNA としては、翻訳開始点の上流にプロモーターとリボゾーム結合部位を有している上記 DNA、あるいは翻訳開始点の上流に転写に必要なプロモーター等が組み込まれた DNA が挙げられる。*in vitro* 翻訳システムは、市販のシステム、例えば Expressway™ システム (Invitrogen 社)、TNT システム (登録商標 ; Promega 社) などを用いることができる。*in vitro* 翻訳システムによる Del-1 部分断片の翻訳後は、上記生化学的方法を単独で、又は適宜組み合わせることにより、目的の断片を単離精製することができる。

4. 目的遺伝子の発現産物の回収

Del-1 部分断片及び目的分子を発現する細胞系又は動植物は、目的遺伝子が発現させることにより、その発現産物である目的分子（例えば、タンパク質、抗体、ペプチド、天然若しくは合成化合物、他の細胞、又は可溶性分子）を回収するために使用することができる。また、Del-1 部分断片を直接使用することもできる。

目的分子を回収する方法を以下に説明する。まず、目的分子と Del-1 部分断片とが結合した融合タンパク質を作製する。すなわち、当該分子をコードする DNA 及び Del-1 部分断片コードする DNA を連結し、これを適当なベクターに連結する。これを宿主細胞に導入して培養し、目的分子が連結した融合タンパク質を作製する。ベクターへの連結、細胞への導入、形質転換細胞の培養法、形質転換体の飼育栽培法は前記 2 項、3 項の説明と同様である。

形質転換細胞を用いる場合、上記融合タンパク質のうち、Del-1 部分断片の全部

又はその一部の領域は、培養容器上に広がる細胞外基質に沈着する。従って、培養後に培養上清及び細胞を除去しても、融合タンパク質は細胞外基質に沈着した状態で培養容器に残存している。そこで、培養容器から培養上清及び細胞を除去した後、融合タンパク質が沈着している細胞外基質を機械的にかきとることにより、目的分子を回収することができる。また、あらかじめ目的分子の DNA 塩基配列と Del-1 部分断片の塩基配列の間に特異的な酵素（例えば Factor Xa）の切断配列を挿入しておけば、その酵素を用いて目的分子のみ回収することも可能である。また、Del-1 部分断片の陰性調節領域を加えることで溶液中に回収することも可能である。

ここで、Del-1 部分断片と発現目的分子とが結合している融合タンパク質から、発現目的分子を同定し単離するために、Del-1 部分断片に標識を付けることが必要である。Del-1 部分断片は、アルカリホスファターゼ若しくは西洋わさびパーオキシダーゼ等の酵素、あるいはフルオレセインイソチオシアナート(FITC)、フィコシアニン若しくはローダミンを含む蛍光標識などの試薬を用いて標識することができる。

また、本発明の Del-1 部分断片は、細胞外基質への沈着活性を有するため、結合検定、アフィニティークロマトグラフィー、免疫沈降法、ウエスタン法などに利用することができる。

Del-1 部分断片と結合できる発現目的ポリペプチドの同定は、組換え Del-1 部分断片によるペプチドライブラリーのスクリーニングによって行うことも可能である。

標識された前記融合タンパク質をランダムペプチドライブラリーとともにインキュベートし、Del-1 部分断片とライブラリー中のペプチドとを結合させる。次にそのライブラリーを洗浄し、未結合のポリペプチドを除去する。アルカリホスファターゼ又はパーオキシダーゼの基質、たとえば、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート(BCIP)、3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)を含むウェルにライブラリーのペプチドを添加し、数分インキュベートすると、アルカリホスファターゼ等が発色するため、目的分子を容易に同定し単離することができる。

形質転換体が動植物の場合、上記融合タンパク質を特定の部位に発現させると、本発明の Del-1 部分断片は細胞外基質に沈着するため、目的タンパクはその組織で

濃縮される。従ってその農畜産物を直接食することや生化学的に抽出することで効率的に目的分子を回収し利用できる。

5. 細胞外基質への沈着部位の同定

- 5 前記1項において説明したように、本発明の Del-1 部分断片は、細胞外基質への沈着活性を有する。沈着性マーカーを使用することにより、本発明の Del-1 部分断片は、視覚的に細胞外基質への沈着部位を観察することができる。

従って、本発明の Del-1 部分断片は、細胞外基質への沈着部位を同定するための試薬として使用することができ、マーカー、発色基質、マーカーに対する抗体等と

- 10 ともに、細胞外基質沈着部位同定用キットに含めることができる。

6. 生物活性物質の生体内特定部位への固定

- 15 目的分子と本発明の Del-1 部分断片とからなる融合タンパク質を特定組織内で発現させた場合、その目的分子は細胞外基質の所定の部位に固定され他の部位へ移行しない。結果として、その部位で濃縮される。

これによって、本発明の Del-1 部分断片をコードする塩基配列は、適切な細胞、組織又は臓器に特異的なプロモーター配列と組み合わせて、目的分子を特定組織に発現させ、固定、限定、濃縮するためのベクターとして使用することができる。

- 20 さらに BCIP を用いた染色により、細胞外アルカリホスファターゼ活性は細胞外基質に存在することがわかった。(実施例2)

このように、Del-1 タンパク質の部分断片は、全長 Del-1 タンパク質よりはるかに強力な細胞外基質沈着能を有し、アルカリホスファターゼのような他のタンパク質を細胞外基質に固定する働きがあることを意味している。

25 7. 生物活性物質による人工物の修飾

ある生物活性物質と Del-1 部分断片の融合蛋白を産生する大腸菌や細胞を人工物上で培養することで、人工物に生物活性物質をその生物学的機能を損なうことなく沈着させることができる。例えば、図2の結果は、培養皿という人工物がアルカリ

ホスファターゼという活性物質で修飾されたことを示している。血液透析の膜や植え込み用人工素材の修飾に応用できる。

8. 沈着活性の調節、薬物送達システム

- 5 本発明の Del-1 部分断片は、目的分子を結合することにより当該目的分子を細胞外基質に沈着させることができる。また、本発明の Del-1 部分断片は、陽性調節領域と陰性調節領域を利用することで、沈着活性を人為的に調節することができる。
- 例えば、図 1 に示す YB 領域又は XC 領域の存在又は不存在により、あるいはこれらの領域の長さを適宜変えることにより、沈着活性の程度を変えることができる(図 10 1 の 4-8, 4-13, 4-1, XY 等)。具体的には、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列のうち、活性中心領域 CY (配列番号 4、5) と陽性調節領域 (配列番号 19、20) とを含む断片、活性中心領域 CY (配列番号 4、5) と陰性調節領域 (配列番号 21、22) とを含む断片、あるいはこれらの両者を、細胞外基質と反応させることにより、陽性調節又は陰性調節によって種々の強さの沈着活性を得る。従って、目的分子を所定の薬理作用を有するタンパク質とすれば、本発明の融合タンパク質を薬物送達システム (ドラッグデリバリーシステム: DDS) として使用することも可能である。例えば、中心領域及び陽性調節領域を含む 4-1 と、抗ガン剤の前駆体を抗ガン剤に変換する酵素の融合蛋白をコードする遺伝子をガン組織に遺伝子導入しておく。その後、抗ガン剤の前駆体を大量に投与すると、ガン組織で健常組織に対して高い薬物濃度を得ることができる。治療後に陰性調節領域を含む CB (配列番号 13、14) の遺伝子を導入することにより、先に導入した遺伝子産物が血中に遊離し、血液透析などで除去することが可能になる。

実施例

- 25 以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

〔実施例 1〕 Del-1 部分断片の作製

受精後 9 から 12 日のマウス胎児より TRIzol (Invitrogen 社)を用いて RNA を抽

出した。それを鋳型とし、Superscript II (Invitrogen 社)を用いて逆転写反応を行い cDNA を作製した。配列番号 2 に示すアミノ酸配列のうち、シグナルペプチドの配列を除いた塩基配列 697～2089 を、PCR で増幅した後にベクターに挿入できる様に、プライマーの 5 末端に制限酵素認識配列を入れた。プライマーの塩基配列は

5 以下の通りである。

Forward primer; AAA GAT CTA ACC CGA ACC CCT GTG AA (配列番号 25)

Reverse primer; AAC TCG AGC ATT GTG GGA TGT GCG (配列番号 26)

PCR は、以下の反応液組成を用いて、94℃で 30 秒、62℃で 30 秒、72℃で 1 分 30 秒の反応を 35 回行った。

10

反応液組成 (50 μ l 中) :		
逆転写酵素産生 cDNA	5 μ l	
プライマー	各 1 μ M	
dNTP	各 0.5mM	
ポリメラーゼ	2unit	
緩衝液	10mM	Tris-HCl(pH8.3)
	50mM	KCl
	1.5mM	MgCl ₂

この PCR 産物を制限酵素の Bgl II と Xho I で処理し、プラスミド pAPtag-5(フナコシ社)に連結した。この様にして作製したプラスミドを Xho I で切断した後、Exonuclease III (タカラバイオ社)で 10 秒から 2 分処理して、図 1 に示す様々な長さの Del-1 部分断片 (4-8, 4-13, 4-14, 4-1, 4-11, 2-6, Del-1 minor, 1-1, 2-3) を作製した。また、PCR を用いて図 1 に示す様々な長さの Del-1 部分断片 (CB, CY, YB, XY, XC, human XY, AP only)、および、図 1 に示されていない、Del-1 部分断片 FB (配列番号 1 に示す塩基配列の 1576～2058 番)、4-15 (配列番号 8)、CE (配列番号 16) を作製した。

20

〔実施例 2〕 Del-1 部分断片の細胞外基質への沈着活性

(1) 実施例 1 で作製した部分断片のうち、4-8, 4-13, 4-14, 4-1, 4-11, 2-6, Del-1

minor, 1-1, 2-3 をプラスミド pAPtag-5(フナコシ社)に連結し、cos7 細胞に導入した。導入後 3 日後に培養上清、細胞及び細胞外基質を採取した。まず上清を採取した後、0.05%EDTA を含む PBS を加えてインキュベートすることで細胞が培養皿の底から剥がれて採取可能になり、培養皿の底には細胞外基質が残される。こうしてそれぞれに含まれるアルカリホスファターゼ活性を検出した。対照として、野生型全長 Del-1 (AP4Del-1) 及び培地のみのサンプルを作製し、アルカリホスファターゼ活性を検出した。アルカリホスファターゼ活性は、上清の活性に対する細胞外基質の比 (AP 活性比 ECM/Medium) として求め、図 1 の右側にグラフで表示した。

図 1 より、4-1、4-8、4-14 及び 4-13 が野生型 Del-1 (Del-1 major) よりも活性が強く、4-11 及び 2-6 は野生型 Del-1 よりも活性は低下し、Del-1 minor ではほとんど活性が認められなかった。

沈着活性の中心領域を検討するため、CB (配列番号 1 に示す塩基配列の 1270~2058 番)、CY、YB、XY、XC、human XY および AP only を発現させて上記と同様にしてアルカリホスファターゼ活性を測定した。

その結果、XY と human XY では、野生型全長 Del-1 よりも高いアルカリホスファターゼ活性が認められ、また CB と CY では、野生型全長 Del-1 よりも高くないが、ある程度のアルカリホスファターゼ活性が認められた。これに対し、XC と YB ではアルカリホスファターゼ活性が認められなかった。

これらの結果から、活性中心領域は配列番号 3 で示される CY (配列番号 1 に示す塩基配列の 1270~1662 番目の領域)、配列番号 2 に示すアミノ酸配列の 218~348 番目のアミノ酸配列の領域であると考えられた。

CY に XC を連結させた XY は、前記活性中心領域 CY のみに比べて約 10 倍の沈着活性を有する。また、XC のみでは、沈着活性をほとんど有しない。したがって、XC は細胞外基質への沈着活性を向上させる、細胞外基質への沈着活性の陽性調節領域であると考えられた。

他方、CY に YB を連結させた CB は、前記活性中心領域 CY のみに比べて、沈着活性が約 0.5 倍に低減する。したがって、YB は細胞外基質への沈着活性を低減させる、細胞外基質への沈着活性の陰性調節領域であると考えられた。

(2) さらに、実施例 1 で作製した Del-1 部分断片のうち、Del-1 minor (配列番号 1 に示す塩基配列の 619~1271 番) 又は 4-1 をプラスミド pAPtag-5(フナコシ社) に連結し、cos7 細胞に導入した。導入後 3 日後に培養上清、細胞及び細胞外基質を採取した。まず上清を採取した後、0.05%EDTA を含む PBS を加えてインキュベーターすることで細胞が培養皿の底から剥がれて採取可能になり、培養皿の底には細胞外基質が残される。そして、それぞれに含まれるアルカリホスファターゼ活性を検出した。

結果を図 2 に示す。図 2 において、A~D は Del-1 minor を用いて作製したサンプルの結果であり、E~H は、4-1 を用いて作製したサンプルの結果である。また、A 及び E は細胞を沈着性アルカリホスファターゼ基質 (BCIP) で染色したものである。B 及び F は、細胞を 0.05%EDTA を用いて剥がした後、残った細胞外基質を BCIP で染色した結果である。C 及び G は、細胞を 0.05%EDTA を用いて剥がした後、残った細胞外基質に可溶性アルカリホスファターゼ基質 (PNPP) を加えて発色させたときの結果である。D 及び H は、従来行われていたように、細胞培養液 (培養上清) に PNPP を加え発色反応させたときの結果である。

紫色に染まった箇所がアルカリホスファターゼ活性部位、すなわち 4-1 の沈着部位である (E,F)。図 2 E 及び F の結果から、4-1 は細胞及び細胞外基質に沈着したことが分かる。これに対し、Del-1 minor は、細胞及び細胞外基質のいずれにも沈着しなかった (A,B)。

同様に、4-1 を用いたときは、細胞外基質は可溶性基質である PNPP によって黄色に染色されたのに対し (G)、Del-1 minor を用いたときは全く染色されなかった (C)。また、細胞培養液に PNPP を加え発色反応を行なった場合において、Del-1 minor を用いたときは培養液が黄色に染色されたのに対し (D)、4-1 を用いたときは発色しなかった (H)。従って、4-1 は細胞外基質に沈着し、Del-1 minor はほとんど沈着しなかったことが分かる。

ところで、本発明においては、図 2 G に示すように可溶性アルカリホスファターゼを用いて基質を発色させることにより、そのまま吸光度計などを用いて細胞外基

質中のアルカリホスファターゼ活性を測定することができる。

そこで、Del-1 部分断片（4-1）及び全長 Del-1 について、細胞外基質内及び培養上清中のアルカリホスファターゼ活性を測定し、両者を比較したところ、Del-1 部分断片（4-1）は全長 Del-1 より 2.5 倍も基質への沈着活性が高かった。

5

(3) 実施例 1 で作製した Del-1 部分断片のうち、配列番号 1 7 で示す切断型 Del-1 遺伝子配列 (XY) とアルカリホスファターゼ遺伝子とを連結した DNA (AP/XY) を導入したマウスの肝臓と、その対照として、アルカリホスファターゼ遺伝子 (AP) のみ導入したマウスの肝臓を調製した。遺伝子導入から 24 時間後に、各肝臓から血漿と肝組織を採取して、アルカリホスファターゼ活性を測定した。

10

ここで、遺伝子導入効率を標準化するため、ベクターガラクトシダーゼ遺伝子を、前記 AP/XY または AP と同時に導入し、アルカリホスファターゼ活性と共にベクターガラクトシダーゼ活性も測定した。そして、測定されたベクターガラクトシダーゼ活性をベクターガラクトシダーゼ活性の値で割った商を測定値 (AP/Lac 比) とした。また、アルカリホスファターゼ遺伝子 (AP) のみを導入したマウスの肝臓から採取した血漿または肝組織の AP/Lac 比を「1」とした場合の、XY とアルカリホスファターゼ遺伝子とを連結した DNA (AP/XY) を導入したマウスの肝臓から採取した血漿または肝組織中の AP/Lac 比をグラフに示した。図 3 は各肝臓から採取した血漿中の AP/Lac 比を示したものであり、図 4 は各肝臓から採取した肝組織中の AP/Lac 比を示したものである。

15

20

肝組織中の AP/Lac 比に関しては、AP/XY を導入した肝臓から採取した肝組織の方が、AP のみを導入した肝臓から採取した肝組織に比べて約 8 倍の AP/Lac 比を示した (図 4)。これに対し、血漿中の AP/Lac 比に関しては、AP/XY を導入した肝臓から採取した血漿では、AP 活性がほとんど検出されなかったため、その AP/Lac 比もほとんど 0 であった。

25

(4) (3) で調製した、AP/XY を導入したマウスの肝臓から肝組織の凍結切片を 3 つ作製した (B, E, F)。同様に、AP のみ導入したマウスの肝臓から肝組織の凍結切

片をそれぞれ3つ作製した (A, C, D)。

図5は、各肝臓から採取した肝組織の凍結切片を用いてアルカリホスファターゼ染色 (A, B, C, E) と β ガラクトシダーゼ (D, F) による染色を示す図である。AとBは40倍、C, D, E, Fは200倍の倍率での観察である。AP(A)に対し、AP/XY(B)が著明に沈着していることがわかる。C, DとE, Fはそれぞれ連続切片であり、アルカリホスファターゼ染色と β ガラクトシダーゼ染色の両方で染色した。AP(C, D)でもAP/XY(E, F)同様に β ガラクトシダーゼ染色 (D, F) で染まっており、遺伝子導入効率に差がないことがわかる。

10 (5) 次に、ウェスタンブロット法を用いて、全長 Del-1 および実施例1で作製した Del-1 部分断片である XY を検出した。具体的には、下記の3種の遺伝子を用意し、各遺伝子を cos7 細胞に導入した。

(i) 配列番号1で示す全長 Del-1 遺伝子配列 (Del-1 major) とアルカリホスファターゼ遺伝子とを連結した DNA (AP/Del-1)

15 (ii) 配列番号17で示す切断型 Del-1 遺伝子配列 (XY) とアルカリホスファターゼ遺伝子とを連結した DNA (AP/XY)

(iii) また、その対照として、アルカリホスファターゼ遺伝子のみ (AP) と遺伝子を導入していない (NC) cos7 細胞も用意した。

次に、前記4種の cos7 細胞をそれぞれ72時間培養し、培養液 (medium) と細胞外基質 (ECM) を採取してウェスタンブロットを行った。コントロールとしてラミニン (Laminin) とアルブミン (Albmin) を用いた。

図6は、ウェスタンブロット法による電気泳動を示す写真である。ラミニンをコントロールとして用いた電気泳動を示す写真が上段に、アルブミンをコントロールとして用いた電気泳動を示す写真が下段に配置されている。

25 図6によれば、APのみを導入した cos7 細胞では、遺伝子を導入されていない (NC) cos7 細胞と同様、細胞外基質にアルカリホスファターゼの組換えタンパク質が検出されなかったが、培地では前記組換えタンパク質が検出された。これに対し、AP/Del-1 または AP/XY を導入した cos7 細胞では、細胞外基質においてアルカ

リホスファターゼの組換えタンパク質が高度に検出された。

〔実施例 3〕 目的分子の回収

5 本実施例は、アルカリホスファターゼを目的遺伝子の発現産物として回収した例を示すものである。アルカリホスファターゼの回収は、アルカリホスファターゼの基質との発色反応により検出を行うことで確認した。

アルカリホスファターゼ遺伝子と切断型 Del-1 遺伝子配列(4-1)を連結した DNA を導入した cos7 細胞と、対照として、野生型 cos7 細胞およびアルカリホスファターゼ遺伝子のみ導入した cos7 細胞を調製した。

10 それらの細胞を 3 日間培養した後に、0.05%EDTA 溶液で細胞を取り除き、スクレーパーで底面の細胞外基質を回収した。回収したサンプルを遠心器にかけて、遠心の後の上清を取り除くことによってペレットを作製した後、実施例 2 (図 3 B,F) と同様の操作を行いアルカリホスファターゼの基質である BCIP を加えて発色させた。

15 結果を図 7 に示す。図 7 において、(a)は野生型 cos7 細胞、(b)はアルカリホスファターゼ遺伝子のみを導入した cos7 細胞、(c)は 4-1 部分断片とアルカリホスファターゼ遺伝子を連結した融合遺伝子を導入した cos7 細胞の結果である。図 4 に示したように、Del-1 部分断片 (4-1) を導入したサンプル(c)ではペレットが濃青紫に染色された。これによって、不溶性の細胞外基質に Del-1 部分断片 (4-1) を介してアルカリホスファターゼが回収されたことがわかった。これに対し、対照ではほとん
20 ど発色しなかったことから、アルカリホスファターゼはほとんど回収されないことが示された。

産業上の利用可能性

25 本発明の Del-1 部分断片を用いることによって、目的分子を細胞外基質や人工素材に効率的に沈着させることができ、また当該沈着によって、目的分子を回収又は除去に用いることができる。 本発明により Del-1 部分断片を用いて目的分子を細胞外基質上に沈着させ、血漿への流出を高度に防止することができるため、本発明

の Del-1 部分断片と当該目的分子とを有する融合タンパク質は、副作用の少ないドラッグデリバリーシステムとして用いることができる。さらに、本発明の Del-1 部分断片を用いて沈着活性を調整することによって、当該目的分子の局所における濃縮や限局の程度を高度にコントロールすることができ、極めて高機能なドラッグデリバリーシステムとして用いることができる。

5

請求の範囲

1. 以下の (a)又は(b)のタンパク質。
 - (a) 配列番号 1 8 若しくは 2 4 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質
 - 5 (b) 配列番号 1 8 若しくは 2 4 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、細胞外基質への沈着活性を有するタンパク質
2. 以下の (a)又は(b)のタンパク質。
 - (a) 配列番号 6、8、1 0、1 2、1 8 若しくは 2 4 に示されるアミノ酸配列か
10 らなるタンパク質
 - (b) 配列番号 6、8、1 0、1 2、1 8 若しくは 2 4 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ、細胞外基質への沈着活性を有するタンパク質
3. 以下の (a)又は(b)のタンパク質。
 - 15 (a) 配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質
 - (b) 配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、細胞外基質への沈着を抑制する活性を有するタンパク質
4. 以下の (a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。
 - 20 (a) 配列番号 1 8 若しくは 2 4 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質
 - (b) 配列番号 1 8 若しくは 2 4 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、細胞外基質への沈着活性を有するタンパク質
5. 以下の (a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。
 - 25 (a) 配列番号 6、8、1 0、1 2、1 8 若しくは 2 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質
 - (b) 配列番号 6、8、1 0、1 2、1 8 若しくは 2 4 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配

列からなり、かつ、細胞外基質への沈着活性を有するタンパク質

6. 以下の (a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

(a) 配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質

(b) 配列番号 1 4 に示されるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が
5 欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、細胞外基質への沈着を抑制する活性を有するタンパク質

7. 以下の(a)又は(b)の DNA を含む遺伝子。

(a) 配列番号 1 7 若しくは 2 3 に示される塩基配列を含む DNA

(b) 配列番号 1 7 若しくは 2 3 に示される塩基配列からなる DNA に対し相補的
10 な塩基配列を含む DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、細胞外基質への沈着活性を有するタンパク質をコードする DNA

8. 以下の(a)又は(b)の DNA を含む遺伝子。

(a) 配列番号 5、7、9、11、17 若しくは 2 3 に示される塩基配列からなる
DNA

(b) 配列番号 5、7、9、11、17 若しくは 2 3 に示される塩基配列からなる
15 DNA に対し相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、細胞外基質への沈着活性を有するタンパク質をコードする DNA

9. 以下の(a)又は(b)の DNA を含む遺伝子。

20 (a) 配列番号 1 3 に示される塩基配列を含む DNA

(b) 配列番号 1 3 に示される塩基配列からなる DNA に対し相補的な塩基配列を含む DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、細胞外基質への沈着を抑制する活性を有するタンパク質をコードする DNA

10. 請求項 4～9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を含む組換えベクター。

25 11. 請求項 10 記載の組換えベクターを含む形質転換体。

12. 請求項 11 記載の形質転換体を培養し、得られる培養物から Del-1 タンパク質の部分断片を採取することを特徴とする Del-1 部分断片の製造方法。

13. 請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のタンパク質と細胞外基質とを反応させ

ることにより、前記タンパク質が前記細胞外基質に沈着する部位を同定する方法。

- 1 4. 請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のタンパク質を含む、細胞外基質沈着部位同定用試薬。
- 5 1 5. 請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のタンパク質と発現の目的分子とが連結した融合タンパク質。
- 1 6. 請求項 1 5 記載の融合タンパク質を含有する薬物送達システム。
- 1 7. 請求項 4～9 のいずれか 1 項に記載の遺伝子と、発現の目的分子をコードする遺伝子とが連結された、融合タンパク質をコードする遺伝子。
- 10 1 8. 請求項 1 7 記載の遺伝子を含む組換えベクター。
- 1 9. 請求項 1 8 記載の組換えベクターを含む形質転換体。
- 2 0. 請求項 1 9 記載の形質転換体を培養し、得られる培養物から Del-1 タンパク質の部分断片と発現の目的分子との融合タンパク質を採取することを特徴とする該融合タンパク質の製造方法。
- 15 2 1. 請求項 1 5 記載の融合タンパク質を細胞外基質に沈着させ、目的分子を採取することを特徴とする目的分子の回収方法。
- 2 2. 目的分子を沈着させる方法であって、以下の工程：
 - (a) 請求項 1 9 記載の形質転換体を培養することによって、発現の目的分子と Del-1 タンパク質の部分断片との融合タンパク質を生産させる工程、及び
 - 20 (b) 前記融合タンパク質を細胞外基質に沈着させる工程を含む前記方法。
- 2 3. 目的分子を回収する方法であって、以下の工程：
 - (a) 請求項 1 9 記載の形質転換体を培養することによって、発現の目的分子と Del-1 タンパク質の部分断片との融合タンパク質を生産させる工程、
 - 25 (b) 前記融合タンパク質を細胞外基質に沈着させる工程、及び
 - (c) 前記融合タンパク質から目的タンパク質を切断することによって、前記目的分子を採取する工程を含む前記方法。

24. 配列番号2に示されるアミノ酸配列のうち、活性中心領域と陽性調節領域とを含む断片、及び/又は活性中心領域と陰性調節領域とを含む断片を細胞外基質と反応させることを特徴とする、細胞外基質への沈着活性を調節する方法。

25. 活性中心領域のアミノ酸配列が配列番号4に示されるものである請求項24記載の方法。

26. 陽性調節領域のアミノ酸配列が配列番号20に示されるものである請求項24記載の方法。

27. 陰性調節領域のアミノ酸配列が配列番号22に示されるものである請求項24記載の方法。

図 1

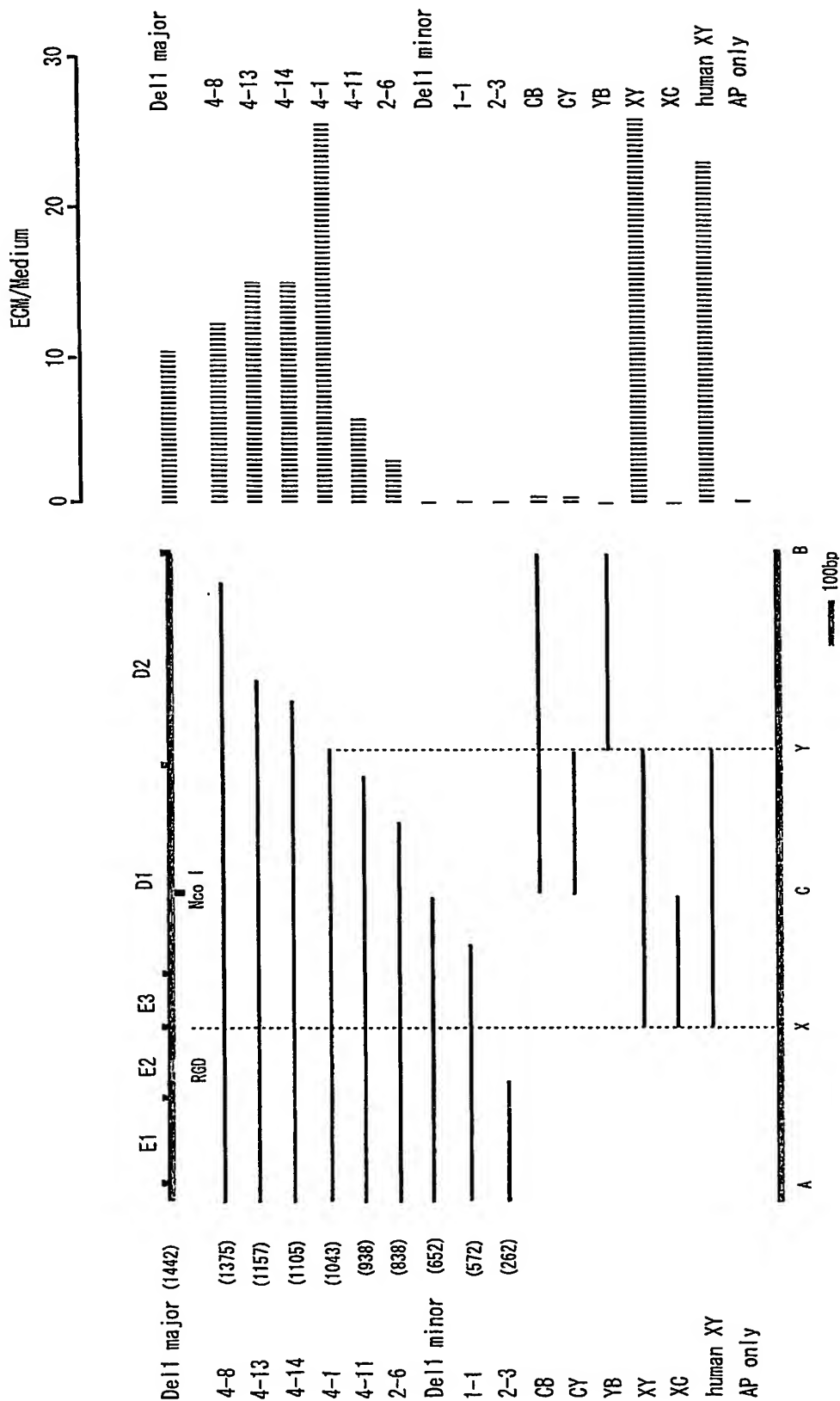


図 2

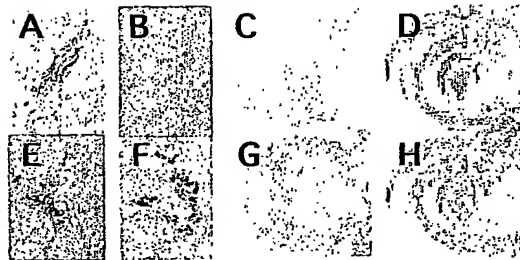


図 3

血漿中のAP活性の比較

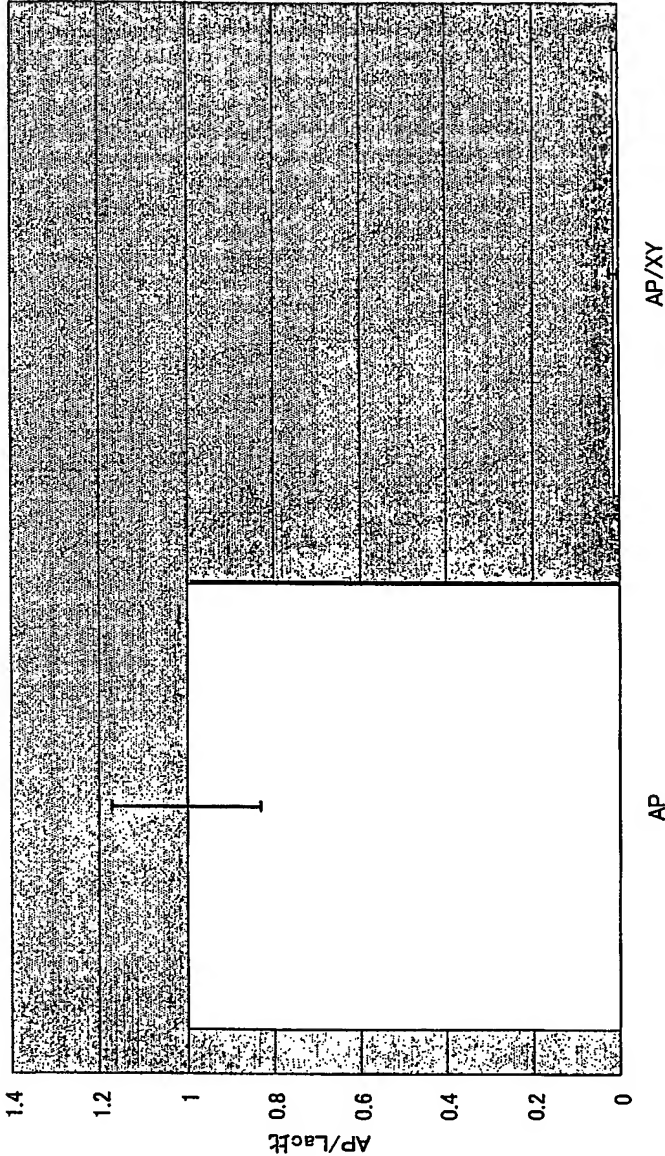
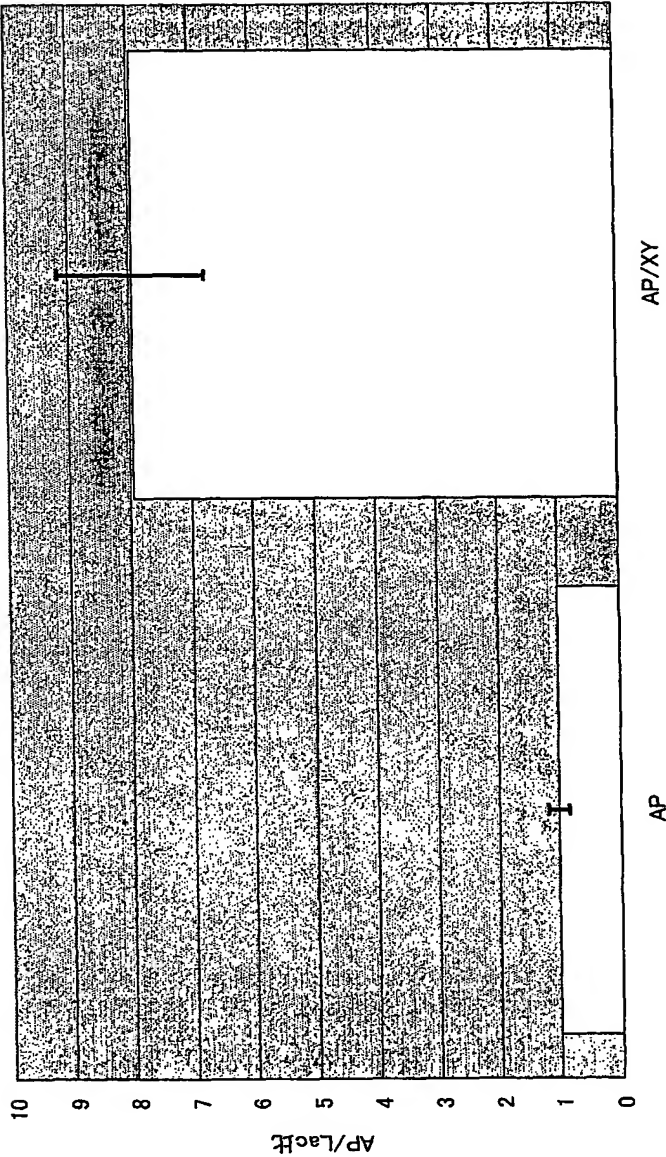


図 4

組織中のAP活性比



5
[X]

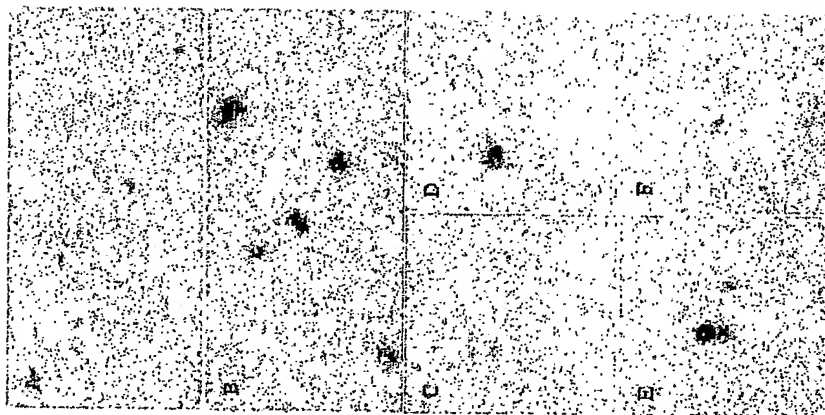


図 6

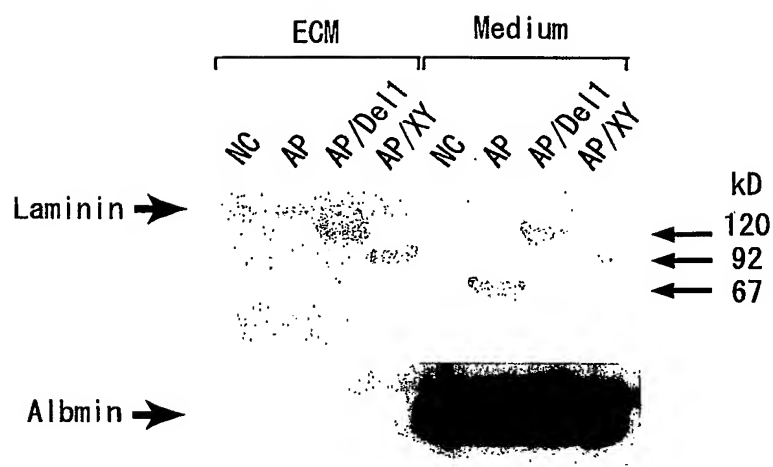
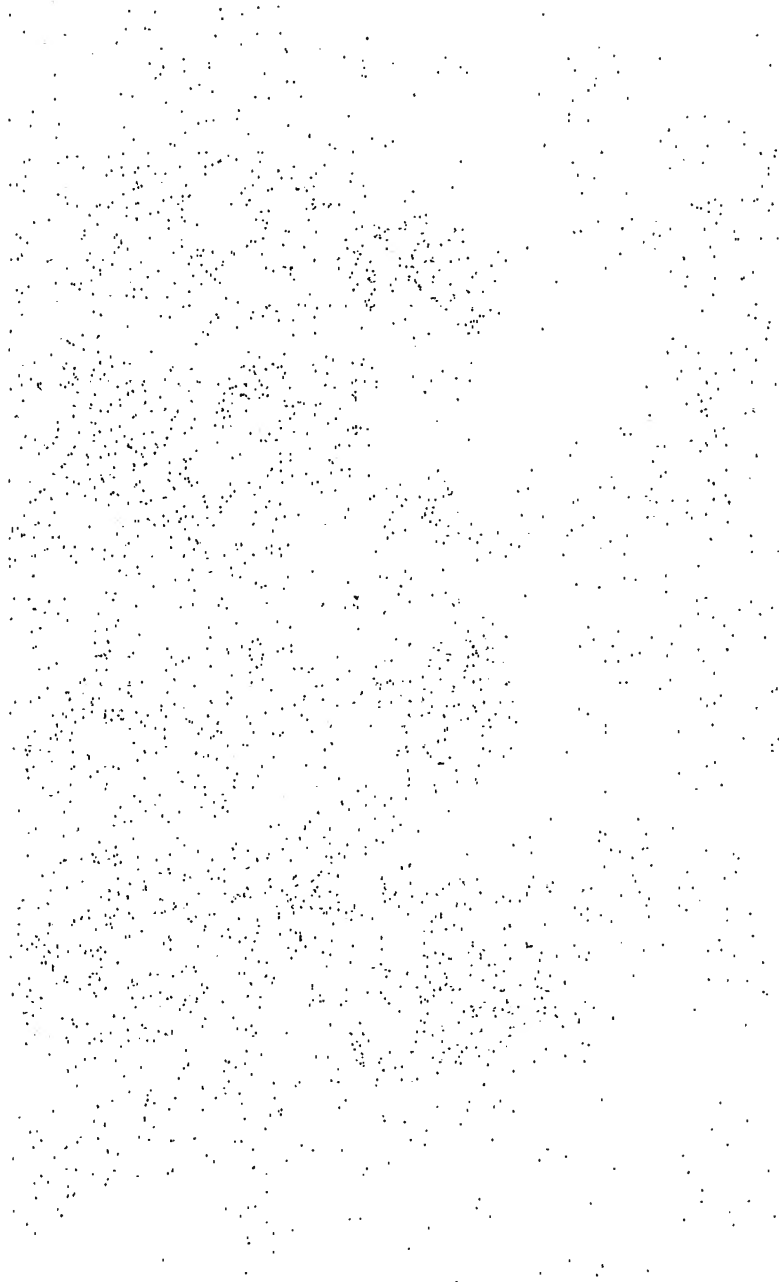


図 7

(a) (b) (c)



SEQUENCE LISTING

<110> NIHON UNIVERSITY

<120> Truncated Del-1 protein

<130> P03-0057PCT

<150> JP2003-188598

<151> 2003-06-30

<160> 26

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 2303

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (619).. (2061)

<400> 1

```

gaattccggt taactgagga caaagggtaa tgcagaagtg atatttgatt tccattctca    60
ttcccagtgg ccttgatatt taaactgatt cctgccacca ggtccttggg ccaccctgtc    120
cctgcgtctc atatttctgc atgctgcttt gtttgtatat agtgcgctcc tggcctcagg    180
ctcgctcccc tccagctctc gcttcattgt tctccaagtc agaagcccc gcatccgccg    240
cgcagcagcg tgagccgtag tcaactgctgg ccgcttcgcc tgcgtgcgcg cacggaaatc    300
ggggagccag gaacccaagg agccgccgtc cgcccgctgt gcctctgcta gaccactcgc    360
agccccagcc tctctcaagc gcaccaccti ccgcgcaccc cagctcagge gaagctggag    420

```

tgagggtgaa tcaccctttc tctagggcca ccactctttt atcgcccttc ccaagatttg	480
agaagcgctg cgggaggaaa gacgtcctct tgatctctga cagggcgggg tttactgctg	540
tcctgcaggc gcgcctcgcc tactgtgccc tccgctacga ccccggaacca gcccagggtca	600
cgctccgtgag aagggatc atg aag cac ttg gta gca gcc tgg ctt ttg gtt	651
Met Lys His Leu Val Ala Ala Trp Leu Leu Val	
1 5 10	
gga ctc agc ctc ggg gtg ccc cag ttc ggc aaa ggt gac att tgc aac	699
Gly Leu Ser Leu Gly Val Pro Gln Phe Gly Lys Gly Asp Ile Cys Asn	
15 20 25	
ccg aac ccc tgt gaa aat ggt ggc atc tgt ctg tca gga ctg gct gat	747
Pro Asn Pro Cys Glu Asn Gly Gly Ile Cys Leu Ser Gly Leu Ala Asp	
30 35 40	
gat tcc ttt tcc tgt gag tgt cca gaa ggc ttc gca ggt ccg aac tgc	795
Asp Ser Phe Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Phe Ala Gly Pro Asn Cys	
45 50 55	
tct agt gtt gtg gag gtt gca tca gat gaa gaa aag cct act tca gca	843
Ser Ser Val Val Glu Val Ala Ser Asp Glu Glu Lys Pro Thr Ser Ala	
60 65 70 75	
ggt ccc tgc atc cct aac cca tgc cat aac gga gga acc tgt gag ata	891
Gly Pro Cys Ile Pro Asn Pro Cys His Asn Gly Gly Thr Cys Glu Ile	
80 85 90	
agc gaa gcc tat cga gga gac aca ttc ata ggc tat gtt tgt aaa tgt	939
Ser Glu Ala Tyr Arg Gly Asp Thr Phe Ile Gly Tyr Val Cys Lys Cys	
95 100 105	
cct cgg gga ttt aat ggg att cac tgt cag cac aat ata aat gaa tgt	987
Pro Arg Gly Phe Asn Gly Ile His Cys Gln His Asn Ile Asn Glu Cys	
110 115 120	
gaa gct gag cct tgc aga aat ggc gga ata tgt acc gac ctt gtt gct	1035
Glu Ala Glu Pro Cys Arg Asn Gly Gly Ile Cys Thr Asp Leu Val Ala	

125	130	135	
aac tac tct tgt gaa tgc cca gga gaa ttt atg gga cga aat tgt caa			1083
Asn Tyr Ser Cys Glu Cys Pro Gly Glu Phe Met Gly Arg Asn Cys Gln			
140	145	150	155
tat aaa tgc tct ggg cca ttg gga atc gaa ggt ggg atc ata tct aat			1131
Tyr Lys Cys Ser Gly Pro Leu Gly Ile Glu Gly Gly Ile Ile Ser Asn			
160	165	170	
cag caa atc aca gct tca tct act cac cga gct ctt ttt gga ctc cgg			1179
Gln Gln Ile Thr Ala Ser Ser Thr His Arg Ala Leu Phe Gly Leu Arg			
175	180	185	
aag tgg tat ccc tac tat gct cga ctt aat aag aag ggc ctt ata aat			1227
Lys Trp Tyr Pro Tyr Tyr Ala Arg Leu Asn Lys Lys Gly Leu Ile Asn			
190	195	200	
gcc tgg aca gct gct gaa aat gac aga tgg cca tgg att cag ata aat			1275
Ala Trp Thr Ala Ala Glu Asn Asp Arg Trp Pro Trp Ile Gln Ile Asn			
205	210	215	
ttg caa aga aaa atg aga gtc act ggt gtt att acc caa gga gca aaa			1323
Leu Gln Arg Lys Met Arg Val Thr Gly Val Ile Thr Gln Gly Ala Lys			
220	225	230	235
agg att gga agc cca gag tac ata aaa tcc tac aaa att gcc tac agc			1371
Arg Ile Gly Ser Pro Glu Tyr Ile Lys Ser Tyr Lys Ile Ala Tyr Ser			
240	245	250	
aat gac ggg aag acc tgg gca atg tac aaa gta aaa ggc acc aat gaa			1419
Asn Asp Gly Lys Thr Trp Ala Met Tyr Lys Val Lys Gly Thr Asn Glu			
255	260	265	
gag atg gtc ttt cgt gga aat gtt gat aac aac aca cca tat gct aat			1467
Glu Met Val Phe Arg Gly Asn Val Asp Asn Asn Thr Pro Tyr Ala Asn			
270	275	280	
tct ttc aca ccc cca atc aaa gct cag tat gta aga ctc tac ccc caa			1515
Ser Phe Thr Pro Pro Ile Lys Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr Pro Gln			

285	290	295	
att tgt cga agg cat tgt act tta aga atg gaa ctt ctt ggc tgt gag			1563
Ile Cys Arg Arg His Cys Thr Leu Arg Met Glu Leu Leu Gly Cys Glu			
300	305	310	315
ctc tca ggc tgt tca gaa cct ttg ggg atg aaa tca ggg cat ata caa			1611
Leu Ser Gly Cys Ser Glu Pro Leu Gly Met Lys Ser Gly His Ile Gln			
	320	325	330
gac tac cag atc act gcc tcc agc gtc ttc aga aca ctc aac atg gac			1659
Asp Tyr Gln Ile Thr Ala Ser Ser Val Phe Arg Thr Leu Asn Met Asp			
	335	340	345
atg ttt act tgg gaa cca agg aaa gcc agg ctg gac aag caa ggc aaa			1707
Met Phe Thr Trp Glu Pro Arg Lys Ala Arg Leu Asp Lys Gln Gly Lys			
	350	355	360
gta aat gcc tgg act tcc ggc cat aac gac cag tca caa tgg tta cag			1755
Val Asn Ala Trp Thr Ser Gly His Asn Asp Gln Ser Gln Trp Leu Gln			
	365	370	375
gtt gat ctt ctt gtc cct act aag gtg aca ggc atc att aca caa gga			1803
Val Asp Leu Leu Val Pro Thr Lys Val Thr Gly Ile Ile Thr Gln Gly			
380	385	390	395
gct aaa gat ttt ggt cac gtg cag ttt gtt ggg tca tac aaa cta gct			1851
Ala Lys Asp Phe Gly His Val Gln Phe Val Gly Ser Tyr Lys Leu Ala			
	400	405	410
tac agc aat gat gga gaa cac tgg atg gtg cac cag gat gaa aaa cag			1899
Tyr Ser Asn Asp Gly Glu His Trp Met Val His Gln Asp Glu Lys Gln			
	415	420	425
agg aaa gac aag gtt ttt caa ggc aat ttt gac aat gac act cac agg			1947
Arg Lys Asp Lys Val Phe Gln Gly Asn Phe Asp Asn Asp Thr His Arg			
	430	435	440
aaa aat gtc atc gac cct ccc atc tat gca cga ttc ata aga atc ctt			1995
Lys Asn Val Ile Asp Pro Pro Ile Tyr Ala Arg Phe Ile Arg Ile Leu			

445 450 455
 cct tgg tcc tgg tat gga agg atc act ctg cgg tca gag ctg ctg ggc 2043
 Pro Trp Ser Trp Tyr Gly Arg Ile Thr Leu Arg Ser Glu Leu Leu Gly
 460 465 470 475
 tgc gca gag gag gaa tga agtgcggggc cgcacatccc acaatgcttt 2091
 Cys Ala Glu Glu Glu
 480
 tctttatttt cctataagta tctccacgaa atgaactgtg tgaagctgat ggaaactgca 2151
 ttgttttttt tcaaagtgtt caaattatgg taggctactg actgtctttt taggagtctt 2211
 aagcttgcct ttttaataat ttaatttggg ttcctttgct caactctctt atgtaatatc 2271
 acactgtctg tgagttactc ttcttgttct ct 2303

<210> 2
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 2

Met Lys His Leu Val Ala Ala Trp Leu Leu Val Gly Leu Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Val Pro Gln Phe Gly Lys Gly Asp Ile Cys Asn Pro Asn Pro Cys Glu
 20 25 30

Asn Gly Gly Ile Cys Leu Ser Gly Leu Ala Asp Asp Ser Phe Ser Cys
 35 40 45

Glu Cys Pro Glu Gly Phe Ala Gly Pro Asn Cys Ser Ser Val Val Glu
 50 55 60

Val Ala Ser Asp Glu Glu Lys Pro Thr Ser Ala Gly Pro Cys Ile Pro
 65 70 75 80

Asn Pro Cys His Asn Gly Gly Thr Cys Glu Ile Ser Glu Ala Tyr Arg
 85 90 95

Gly Asp Thr Phe Ile Gly Tyr Val Cys Lys Cys Pro Arg Gly Phe Asn
 100 105 110

Gly Ile His Cys Gln His Asn Ile Asn Glu Cys Glu Ala Glu Pro Cys
 115 120 125

Arg Asn Gly Gly Ile Cys Thr Asp Leu Val Ala Asn Tyr Ser Cys Glu
 130 135 140

Cys Pro Gly Glu Phe Met Gly Arg Asn Cys Gln Tyr Lys Cys Ser Gly
 145 150 155 160

Pro Leu Gly Ile Glu Gly Gly Ile Ile Ser Asn Gln Gln Ile Thr Ala
 165 170 175

Ser Ser Thr His Arg Ala Leu Phe Gly Leu Arg Lys Trp Tyr Pro Tyr
 180 185 190

Tyr Ala Arg Leu Asn Lys Lys Gly Leu Ile Asn Ala Trp Thr Ala Ala
 195 200 205

Glu Asn Asp Arg Trp Pro Trp Ile Gln Ile Asn Leu Gln Arg Lys Met
 210 215 220

Arg Val Thr Gly Val Ile Thr Gln Gly Ala Lys Arg Ile Gly Ser Pro
225 230 235 240

Glu Tyr Ile Lys Ser Tyr Lys Ile Ala Tyr Ser Asn Asp Gly Lys Thr
245 250 255

Trp Ala Met Tyr Lys Val Lys Gly Thr Asn Glu Glu Met Val Phe Arg
260 265 270

Gly Asn Val Asp Asn Asn Thr Pro Tyr Ala Asn Ser Phe Thr Pro Pro
275 280 285

Ile Lys Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr Pro Gln Ile Cys Arg Arg His
290 295 300

Cys Thr Leu Arg Met Glu Leu Leu Gly Cys Glu Leu Ser Gly Cys Ser
305 310 315 320

Glu Pro Leu Gly Met Lys Ser Gly His Ile Gln Asp Tyr Gln Ile Thr
325 330 335

Ala Ser Ser Val Phe Arg Thr Leu Asn Met Asp Met Phe Thr Trp Glu
340 345 350

Pro Arg Lys Ala Arg Leu Asp Lys Gln Gly Lys Val Asn Ala Trp Thr
355 360 365

Ser Gly His Asn Asp Gln Ser Gln Trp Leu Gln Val Asp Leu Leu Val
370 375 380

Pro Thr Lys Val Thr Gly Ile Ile Thr Gln Gly Ala Lys Asp Phe Gly
 385 390 395 400

His Val Gln Phe Val Gly Ser Tyr Lys Leu Ala Tyr Ser Asn Asp Gly
 405 410 415

Glu His Trp Met Val His Gln Asp Glu Lys Gln Arg Lys Asp Lys Val
 420 425 430

Phe Gln Gly Asn Phe Asp Asn Asp Thr His Arg Lys Asn Val Ile Asp
 435 440 445

Pro Pro Ile Tyr Ala Arg Phe Ile Arg Ile Leu Pro Trp Ser Trp Tyr
 450 455 460

Gly Arg Ile Thr Leu Arg Ser Glu Leu Leu Gly Cys Ala Glu Glu Glu
 465 470 475 480

<210> 3
 <211> 393
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (393)

<400> 3
 ata aat ttg caa aga aaa atg aga gtc act ggt gtt att acc caa gga
 Ile Asn Leu Gln Arg Lys Met Arg Val Thr Gly Val Ile Thr Gln Gly
 1 5 10 15

48

gca aaa agg att gga agc cca gag tac ata aaa tcc tac aaa att gcc	96
Ala Lys Arg Ile Gly Ser Pro Glu Tyr Ile Lys Ser Tyr Lys Ile Ala	
20 25 30	
tac agc aat gac ggg aag acc tgg gca atg tac aaa gta aaa ggc acc	144
Tyr Ser Asn Asp Gly Lys Thr Trp Ala Met Tyr Lys Val Lys Gly Thr	
35 40 45	
aat gaa gag atg gtc ttt cgt gga aat gtt gat aac aac aca cca tat	192
Asn Glu Glu Met Val Phe Arg Gly Asn Val Asp Asn Asn Thr Pro Tyr	
50 55 60	
gct aat tct ttc aca ccc cca atc aaa gct cag tat gta aga ctc tac	240
Ala Asn Ser Phe Thr Pro Pro Ile Lys Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr	
65 70 75 80	
ccc caa att tgt cga agg cat tgt act tta aga atg gaa ctt ctt ggc	288
Pro Gln Ile Cys Arg Arg His Cys Thr Leu Arg Met Glu Leu Leu Gly	
85 90 95	
tgt gag ctc tca ggc tgt tca gaa cct ttg ggg atg aaa tca ggg cat	336
Cys Glu Leu Ser Gly Cys Ser Glu Pro Leu Gly Met Lys Ser Gly His	
100 105 110	
ata caa gac tac cag atc act gcc tcc agc gtc ttc aga aca ctc aac	384
Ile Gln Asp Tyr Gln Ile Thr Ala Ser Ser Val Phe Arg Thr Leu Asn	
115 120 125	
atg gac atg	393
Met Asp Met	
130	

<210> 4
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4

Ile Asn Leu Gln Arg Lys Met Arg Val Thr Gly Val Ile Thr Gln Gly
 1 5 10 15

Ala Lys Arg Ile Gly Ser Pro Glu Tyr Ile Lys Ser Tyr Lys Ile Ala
 20 25 30

Tyr Ser Asn Asp Gly Lys Thr Trp Ala Met Tyr Lys Val Lys Gly Thr
 35 40 45

Asn Glu Glu Met Val Phe Arg Gly Asn Val Asp Asn Asn Thr Pro Tyr
 50 55 60

Ala Asn Ser Phe Thr Pro Pro Ile Lys Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr
 65 70 75 80

Pro Gln Ile Cys Arg Arg His Cys Thr Leu Arg Met Glu Leu Leu Gly
 85 90 95

Cys Glu Leu Ser Gly Cys Ser Glu Pro Leu Gly Met Lys Ser Gly His
 100 105 110

Ile Gln Asp Tyr Gln Ile Thr Ala Ser Ser Val Phe Arg Thr Leu Asn
 115 120 125

Met Asp Met
 130

<210> 5
 <211> 1044
 <212> DNA

<213> . Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1044)

<400> 5

atg aag cac ttg gta gca gcc tgg ctt ttg gtt gga ctc agc ctc ggg	48
Met Lys His Leu Val Ala Ala Trp Leu Leu Val Gly Leu Ser Leu Gly	
1 5 10 15	

gtg ccc cag ttc ggc aaa ggt gac att tgc aac ccg aac ccc tgt gaa	96
Val Pro Gln Phe Gly Lys Gly Asp Ile Cys Asn Pro Asn Pro Cys Glu	
20 25 30	

aat ggt ggc atc tgt ctg tca gga ctg gct gat gat tcc ttt tcc tgt	144
Asn Gly Gly Ile Cys Leu Ser Gly Leu Ala Asp Asp Ser Phe Ser Cys	
35 40 45	

gag tgt cca gaa ggc ttc gca ggt ccg aac tgc tct agt gtt gtg gag	192
Glu Cys Pro Glu Gly Phe Ala Gly Pro Asn Cys Ser Ser Val Val Glu	
50 55 60	

gtt gca tca gat gaa gaa aag cct act tca gca ggt ccc tgc atc cct	240
Val Ala Ser Asp Glu Glu Lys Pro Thr Ser Ala Gly Pro Cys Ile Pro	
65 70 75 80	

aac cca tgc cat aac gga gga acc tgt gag ata agc gaa gcc tat cga	288
Asn Pro Cys His Asn Gly Gly Thr Cys Glu Ile Ser Glu Ala Tyr Arg	
85 90 95	

gga gac aca ttc ata ggc tat gtt tgt aaa tgt cct cgg gga ttt aat	336
Gly Asp Thr Phe Ile Gly Tyr Val Cys Lys Cys Pro Arg Gly Phe Asn	
100 105 110	

ggg att cac tgt cag cac aat ata aat gaa tgt gaa gct gag cct tgc	384
Gly Ile His Cys Gln His Asn Ile Asn Glu Cys Glu Ala Glu Pro Cys	
115 120 125	

aga aat ggc gga ata tgt acc gac ctt gtt gct aac tac tct tgt gaa	432
Arg Asn Gly Gly Ile Cys Thr Asp Leu Val Ala Asn Tyr Ser Cys Glu	
130 135 140	
tgc cca gga gaa ttt atg gga cga aat tgt caa tat aaa tgc tct ggg	480
Cys Pro Gly Glu Phe Met Gly Arg Asn Cys Gln Tyr Lys Cys Ser Gly	
145 150 155 160	
cca ttg gga atc gaa ggt ggg atc ata tct aat cag caa atc aca gct	528
Pro Leu Gly Ile Glu Gly Gly Ile Ile Ser Asn Gln Gln Ile Thr Ala	
165 170 175	
tca tct act cac cga gct ctt ttt gga ctc cgg aag tgg tat ccc tac	576
Ser Ser Thr His Arg Ala Leu Phe Gly Leu Arg Lys Trp Tyr Pro Tyr	
180 185 190	
tat gct cga ctt aat aag aag ggc ctt ata aat gcc tgg aca gct gct	624
Tyr Ala Arg Leu Asn Lys Lys Gly Leu Ile Asn Ala Trp Thr Ala Ala	
195 200 205	
gaa aat gac aga tgg cca tgg att cag ata aat ttg caa aga aaa atg	672
Glu Asn Asp Arg Trp Pro Trp Ile Gln Ile Asn Leu Gln Arg Lys Met	
210 215 220	
aga gtc act ggt gtt att acc caa gga gca aaa agg att gga agc cca	720
Arg Val Thr Gly Val Ile Thr Gln Gly Ala Lys Arg Ile Gly Ser Pro	
225 230 235 240	
gag tac ata aaa tcc tac aaa att gcc tac agc aat gac ggg aag acc	768
Glu Tyr Ile Lys Ser Tyr Lys Ile Ala Tyr Ser Asn Asp Gly Lys Thr	
245 250 255	
tgg gca atg tac aaa gta aaa ggc acc aat gaa gag atg gtc ttt cgt	816
Trp Ala Met Tyr Lys Val Lys Gly Thr Asn Glu Glu Met Val Phe Arg	
260 265 270	
gga aat gtt gat aac aac aca cca tat gct aat tct ttc aca ccc cca	864
Gly Asn Val Asp Asn Asn Thr Pro Tyr Ala Asn Ser Phe Thr Pro Pro	
275 280 285	

atc aaa gct cag tat gta aga ctc tac ccc caa att tgt cga agg cat 912
 Ile Lys Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr Pro Gln Ile Cys Arg Arg His
 290 295 300

tgt act tta aga atg gaa ctt ctt ggc tgt gag ctc tca ggc tgt tca 960
 Cys Thr Leu Arg Met Glu Leu Leu Gly Cys Glu Leu Ser Gly Cys Ser
 305 310 315 320

gaa cct ttg ggg atg aaa tca ggg cat ata caa gac tac cag atc act 1008
 Glu Pro Leu Gly Met Lys Ser Gly His Ile Gln Asp Tyr Gln Ile Thr
 325 330 335

gcc tcc agc gtc ttc aga aca ctc aac atg gac atg 1044
 Ala Ser Ser Val Phe Arg Thr Leu Asn Met Asp Met
 340 345

<210> 6
 <211> 348
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 6

Met Lys His Leu Val Ala Ala Trp Leu Leu Val Gly Leu Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Val Pro Gln Phe Gly Lys Gly Asp Ile Cys Asn Pro Asn Pro Cys Glu
 20 25 30

Asn Gly Gly Ile Cys Leu Ser Gly Leu Ala Asp Asp Ser Phe Ser Cys
 35 40 45

Glu Cys Pro Glu Gly Phe Ala Gly Pro Asn Cys Ser Ser Val Val Glu
 50 55 60

Val Ala Ser Asp Glu Glu Lys Pro Thr Ser Ala Gly Pro Cys Ile Pro
 65 70 75 80

Asn Pro Cys His Asn Gly Gly Thr Cys Glu Ile Ser Glu Ala Tyr Arg
 85 90 95

Gly Asp Thr Phe Ile Gly Tyr Val Cys Lys Cys Pro Arg Gly Phe Asn
 100 105 110

Gly Ile His Cys Gln His Asn Ile Asn Glu Cys Glu Ala Glu Pro Cys
 115 120 125

Arg Asn Gly Gly Ile Cys Thr Asp Leu Val Ala Asn Tyr Ser Cys Glu
 130 135 140

Cys Pro Gly Glu Phe Met Gly Arg Asn Cys Gln Tyr Lys Cys Ser Gly
 145 150 155 160

Pro Leu Gly Ile Glu Gly Gly Ile Ile Ser Asn Gln Gln Ile Thr Ala
 165 170 175

Ser Ser Thr His Arg Ala Leu Phe Gly Leu Arg Lys Trp Tyr Pro Tyr
 180 185 190

Tyr Ala Arg Leu Asn Lys Lys Gly Leu Ile Asn Ala Trp Thr Ala Ala
 195 200 205

Glu Asn Asp Arg Trp Pro Trp Ile Gln Ile Asn Leu Gln Arg Lys Met
 210 215 220

Arg Val Thr Gly Val Ile Thr Gln Gly Ala Lys Arg Ile Gly Ser Pro
225 230 235 240

Glu Tyr Ile Lys Ser Tyr Lys Ile Ala Tyr Ser Asn Asp Gly Lys Thr
245 250 255

Trp Ala Met Tyr Lys Val Lys Gly Thr Asn Glu Glu Met Val Phe Arg
260 265 270

Gly Asn Val Asp Asn Asn Thr Pro Tyr Ala Asn Ser Phe Thr Pro Pro
275 280 285

Ile Lys Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr Pro Gln Ile Cys Arg Arg His
290 295 300

Cys Thr Leu Arg Met Glu Leu Leu Gly Cys Glu Leu Ser Gly Cys Ser
305 310 315 320

Glu Pro Leu Gly Met Lys Ser Gly His Ile Gln Asp Tyr Gln Ile Thr
325 330 335

Ala Ser Ser Val Phe Arg Thr Leu Asn Met Asp Met
340 345

<210> 7

<211> 1095

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> .(1).. (1095)

<400> 7

atg aag cac ttg gta gca gcc tgg ctt ttg gtt gga ctc agc ctc ggg 48

Met Lys His Leu Val Ala Ala Trp Leu Leu Val Gly Leu Ser Leu Gly

1

5

10

15

gtg ccc cag ttc ggc aaa ggt gac att tgc aac ccg aac ccc tgt gaa 96

Val Pro Gln Phe Gly Lys Gly Asp Ile Cys Asn Pro Asn Pro Cys Glu

20

25

30

aat ggt ggc atc tgt ctg tca gga ctg gct gat gat tcc ttt tcc tgt 144

Asn Gly Gly Ile Cys Leu Ser Gly Leu Ala Asp Asp Ser Phe Ser Cys

35

40

45

gag tgt cca gaa ggc ttc gca ggt ccg aac tgc tct agt gtt gtg gag 192

Glu Cys Pro Glu Gly Phe Ala Gly Pro Asn Cys Ser Ser Val Val Glu

50

55

60

gtt gca tca gat gaa gaa aag cct act tca gca ggt ccc tgc atc cct 240

Val Ala Ser Asp Glu Glu Lys Pro Thr Ser Ala Gly Pro Cys Ile Pro

65

70

75

80

aac cca tgc cat aac gga gga acc tgt gag ata agc gaa gcc tat cga 288

Asn Pro Cys His Asn Gly Gly Thr Cys Glu Ile Ser Glu Ala Tyr Arg

85

90

95

gga gac aca ttc ata ggc tat gtt tgt aaa tgt cct cgg gga ttt aat 336

Gly Asp Thr Phe Ile Gly Tyr Val Cys Lys Cys Pro Arg Gly Phe Asn

100

105

110

ggg att cac tgt cag cac aat ata aat gaa tgt gaa gct gag cct tgc 384

Gly Ile His Cys Gln His Asn Ile Asn Glu Cys Glu Ala Glu Pro Cys

115

120

125

aga aat ggc gga ata tgt acc gac ctt gtt gct aac tac tct tgt gaa 432

Arg Asn Gly Gly Ile Cys Thr Asp Leu Val Ala Asn Tyr Ser Cys Glu

130

135

140

tgc cca gga gaa ttt atg gga cga aat tgt caa tat aaa tgc tct ggg 480

17/48

Cys Thr Leu Arg Met Glu Leu Leu Gly Cys Glu Leu Ser Gly Cys Ser
 305 310 315 320

gaa cct ttg ggg atg aaa tca ggg cat ata caa gac tac cag atc act 1008
 Glu Pro Leu Gly Met Lys Ser Gly His Ile Gln Asp Tyr Gln Ile Thr
 325 330 335

gcc tcc agc gtc ttc aga aca ctc aac atg gac atg ttt act tgg gaa 1056
 Ala Ser Ser Val Phe Arg Thr Leu Asn Met Asp Met Phe Thr Trp Glu
 340 345 350

cca agg aaa gcc agg ctg gac aag caa ggc aaa gta aat 1095
 Pro Arg Lys Ala Arg Leu Asp Lys Gln Gly Lys Val Asn
 355 360 365

<210> 8
 <211> 365
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8

Met Lys His Leu Val Ala Ala Trp Leu Leu Val Gly Leu Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Val Pro Gln Phe Gly Lys Gly Asp Ile Cys Asn Pro Asn Pro Cys Glu
 20 25 30

Asn Gly Gly Ile Cys Leu Ser Gly Leu Ala Asp Asp Ser Phe Ser Cys
 35 40 45

Glu Cys Pro Glu Gly Phe Ala Gly Pro Asn Cys Ser Ser Val Val Glu
 50 55 60

Val Ala Ser Asp Glu Glu Lys Pro Thr Ser Ala Gly Pro Cys Ile Pro

65		70		75		80									
Asn	Pro	Cys	His	Asn	Gly	Gly	Thr	Cys	Glu	Ile	Ser	Glu	Ala	Tyr	Arg
				85					90					95	
Gly	Asp	Thr	Phe	Ile	Gly	Tyr	Val	Cys	Lys	Cys	Pro	Arg	Gly	Phe	Asn
			100						105					110	
Gly	Ile	His	Cys	Gln	His	Asn	Ile	Asn	Glu	Cys	Glu	Ala	Glu	Pro	Cys
		115					120					125			
Arg	Asn	Gly	Gly	Ile	Cys	Thr	Asp	Leu	Val	Ala	Asn	Tyr	Ser	Cys	Glu
	130					135					140				
Cys	Pro	Gly	Glu	Phe	Met	Gly	Arg	Asn	Cys	Gln	Tyr	Lys	Cys	Ser	Gly
145					150					155					160
Pro	Leu	Gly	Ile	Glu	Gly	Gly	Ile	Ile	Ser	Asn	Gln	Gln	Ile	Thr	Ala
			165						170					175	
Ser	Ser	Thr	His	Arg	Ala	Leu	Phe	Gly	Leu	Arg	Lys	Trp	Tyr	Pro	Tyr
			180					185					190		
Tyr	Ala	Arg	Leu	Asn	Lys	Lys	Gly	Leu	Ile	Asn	Ala	Trp	Thr	Ala	Ala
		195					200					205			
Glu	Asn	Asp	Arg	Trp	Pro	Trp	Ile	Gln	Ile	Asn	Leu	Gln	Arg	Lys	Met
	210						215				220				
Arg	Val	Thr	Gly	Val	Ile	Thr	Gln	Gly	Ala	Lys	Arg	Ile	Gly	Ser	Pro

$\langle 210 \rangle$	9
$\langle 211 \rangle$	1104
$\langle 212 \rangle$	DNA
$\langle 213 \rangle$	Mus musculus

130	135	140	
tgc cca gga gaa ttt atg gga cga aat tgt caa tat aaa tgc tct ggg			480
Cys Pro Gly Glu Phe Met Gly Arg Asn Cys Gln Tyr Lys Cys Ser Gly			
145	150	155	160
cca ttg gga atc gaa ggt ggg atc ata tct aat cag caa atc aca gct			528
Pro Leu Gly Ile Glu Gly Gly Ile Ile Ser Asn Gln Gln Ile Thr Ala			
165	170		175
tca tct act cac cga gct ctt ttt gga ctc cgg aag tgg tat ccc tac			576
Ser Ser Thr His Arg Ala Leu Phe Gly Leu Arg Lys Trp Tyr Pro Tyr			
180	185		190
tat gct cga ctt aat aag aag ggc ctt ata aat gcc tgg aca gct gct			624
Tyr Ala Arg Leu Asn Lys Lys Gly Leu Ile Asn Ala Trp Thr Ala Ala			
195	200		205
gaa aat gac aga tgg cca tgg att cag ata aat ttg caa aga aaa atg			672
Glu Asn Asp Arg Trp Pro Trp Ile Gln Ile Asn Leu Gln Arg Lys Met			
210	215		220
aga gtc act ggt gtt att acc caa gga gca aaa agg att gga agc cca			720
Arg Val Thr Gly Val Ile Thr Gln Gly Ala Lys Arg Ile Gly Ser Pro			
225	230		235
gag tac ata aaa tcc tac aaa att gcc tac agc aat gac ggg aag acc			768
Glu Tyr Ile Lys Ser Tyr Lys Ile Ala Tyr Ser Asn Asp Gly Lys Thr			
245	250		255
tgg gca atg tac aaa gta aaa ggc acc aat gaa gag atg gtc ttt cgt			816
Trp Ala Met Tyr Lys Val Lys Gly Thr Asn Glu Glu Met Val Phe Arg			
260	265		270
gga aat gtt gat aac aac aca cca tat gct aat tct ttc aca ccc cca			864
Gly Asn Val Asp Asn Asn Thr Pro Tyr Ala Asn Ser Phe Thr Pro Pro			
275	280		285
atc aaa gct cag tat gta aga ctc tac ccc caa att tgt cga agg cat			912
Ile Lys Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr Pro Gln Ile Cys Arg Arg His			

Glu Cys Pro Glu Gly Phe Ala Gly Pro Asn Cys Ser Ser Val Val Glu
50 55 60

Val Ala Ser Asp Glu Glu Lys Pro Thr Ser Ala Gly Pro Cys Ile Pro
65 70 75 80

Asn Pro Cys His Asn Gly Gly Thr Cys Glu Ile Ser Glu Ala Tyr Arg
85 90 95

Gly Asp Thr Phe Ile Gly Tyr Val Cys Lys Cys Pro Arg Gly Phe Asn
100 105 110

Gly Ile His Cys Gln His Asn Ile Asn Glu Cys Glu Ala Glu Pro Cys
115 120 125

Arg Asn Gly Gly Ile Cys Thr Asp Leu Val Ala Asn Tyr Ser Cys Glu
130 135 140

Cys Pro Gly Glu Phe Met Gly Arg Asn Cys Gln Tyr Lys Cys Ser Gly
145 150 155 160

Pro Leu Gly Ile Glu Gly Gly Ile Ile Ser Asn Gln Gln Ile Thr Ala
165 170 175

Ser Ser Thr His Arg Ala Leu Phe Gly Leu Arg Lys Trp Tyr Pro Tyr
180 185 190

Tyr Ala Arg Leu Asn Lys Lys Gly Leu Ile Asn Ala Trp Thr Ala Ala
195 200 205

Glu Asn Asp Arg Trp Pro Trp Ile Gln Ile Asn Leu Gln Arg Lys Met
210 215 220

Arg Val Thr Gly Val Ile Thr Gln Gly Ala Lys Arg Ile Gly Ser Pro
225 230 235 240

Glu Tyr Ile Lys Ser Tyr Lys Ile Ala Tyr Ser Asn Asp Gly Lys Thr
245 250 255

Trp Ala Met Tyr Lys Val Lys Gly Thr Asn Glu Glu Met Val Phe Arg
260 265 270

Gly Asn Val Asp Asn Asn Thr Pro Tyr Ala Asn Ser Phe Thr Pro Pro
275 280 285

Ile Lys Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr Pro Gln Ile Cys Arg Arg His
290 295 300

Cys Thr Leu Arg Met Glu Leu Leu Gly Cys Glu Leu Ser Gly Cys Ser
305 310 315 320

Glu Pro Leu Gly Met Lys Ser Gly His Ile Gln Asp Tyr Gln Ile Thr
325 330 335

Ala Ser Ser Val Phe Arg Thr Leu Asn Met Asp Met Phe Thr Trp Glu
340 345 350

Pro Arg Lys Ala Arg Leu Asp Lys Gln Gly Lys Val Asn Ala Trp Thr
355 360 365

<210> 11

<211> 1155

<212> .DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1155)

<400> 11

atg aag cac ttg gta gca gcc tgg ctt ttg gtt gga ctc agc ctc ggg	48
Met Lys His Leu Val Ala Ala Trp Leu Leu Val Gly Leu Ser Leu Gly	
1 5 10 15	
gtg ccc cag ttc ggc aaa ggt gac att tgc aac ccg aac ccc tgt gaa	96
Val Pro Gln Phe Gly Lys Gly Asp Ile Cys Asn Pro Asn Pro Cys Glu	
20 25 30	
aat ggt ggc atc tgt ctg tca gga ctg gct gat gat tcc ttt tcc tgt	144
Asn Gly Gly Ile Cys Leu Ser Gly Leu Ala Asp Asp Ser Phe Ser Cys	
35 40 45	
gag tgt cca gaa ggc ttc gca ggt ccg aac tgc tct agt gtt gtg gag	192
Glu Cys Pro Glu Gly Phe Ala Gly Pro Asn Cys Ser Ser Val Val Glu	
50 55 60	
gtt gca tca gat gaa gaa aag cct act tca gca ggt ccc tgc atc cct	240
Val Ala Ser Asp Glu Glu Lys Pro Thr Ser Ala Gly Pro Cys Ile Pro	
65 70 75 80	
aac cca tgc cat aac gga gga acc tgt gag ata agc gaa gcc tat cga	288
Asn Pro Cys His Asn Gly Gly Thr Cys Glu Ile Ser Glu Ala Tyr Arg	
85 90 95	
gga gac aca ttc ata ggc tat gtt tgt aaa tgt cct cgg gga ttt aat	336
Gly Asp Thr Phe Ile Gly Tyr Val Cys Lys Cys Pro Arg Gly Phe Asn	
100 105 110	
ggg att cac tgt cag cac aat ata aat gaa tgt gaa gct gag cct tgc	384
Gly Ile His Cys Gln His Asn Ile Asn Glu Cys Glu Ala Glu Pro Cys	
115 120 125	

aga aat ggc gga ata tgt acc gac ctt gtt gct aac tac tct tgt gaa	432
Arg Asn Gly Gly Ile Cys Thr Asp Leu Val Ala Asn Tyr Ser Cys Glu	
130 135 140	
tgc cca gga gaa ttt atg gga cga aat tgt caa tat aaa tgc tct ggg	480
Cys Pro Gly Glu Phe Met Gly Arg Asn Cys Gln Tyr Lys Cys Ser Gly	
145 150 155 160	
cca ttg gga atc gaa ggt ggg atc ata tct aat cag caa atc aca gct	528
Pro Leu Gly Ile Glu Gly Gly Ile Ile Ser Asn Gln Gln Ile Thr Ala	
165 170 175	
tca tct act cac cga gct ctt ttt gga ctc cgg aag tgg tat ccc tac	576
Ser Ser Thr His Arg Ala Leu Phe Gly Leu Arg Lys Trp Tyr Pro Tyr	
180 185 190	
tat gct cga ctt aat aag aag ggc ctt ata aat gcc tgg aca gct gct	624
Tyr Ala Arg Leu Asn Lys Lys Gly Leu Ile Asn Ala Trp Thr Ala Ala	
195 200 205	
gaa aat gac aga tgg cca tgg att cag ata aat ttg caa aga aaa atg	672
Glu Asn Asp Arg Trp Pro Trp Ile Gln Ile Asn Leu Gln Arg Lys Met	
210 215 220	
aga gtc act ggt gtt att acc caa gga gca aaa agg att gga agc cca	720
Arg Val Thr Gly Val Ile Thr Gln Gly Ala Lys Arg Ile Gly Ser Pro	
225 230 235 240	
gag tac ata aaa tcc tac aaa att gcc tac agc aat gac ggg aag acc	768
Glu Tyr Ile Lys Ser Tyr Lys Ile Ala Tyr Ser Asn Asp Gly Lys Thr	
245 250 255	
tgg gca atg tac aaa gta aaa ggc acc aat gaa gag atg gtc ttt cgt	816
Trp Ala Met Tyr Lys Val Lys Gly Thr Asn Glu Glu Met Val Phe Arg	
260 265 270	
gga aat gtt gat aac aac aca cca tat gct aat tct ttc aca ccc cca	864
Gly Asn Val Asp Asn Asn Thr Pro Tyr Ala Asn Ser Phe Thr Pro Pro	
275 280 285	

atc aaa gct cag tat gta aga ctc tac ccc caa att tgt cga agg cat	912
Ile Lys Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr Pro Gln Ile Cys Arg Arg His	
290 295 300	
tgt act tta aga atg gaa ctt ctt ggc tgt gag ctc tca ggc tgt tca	960
Cys Thr Leu Arg Met Glu Leu Leu Gly Cys Glu Leu Ser Gly Cys Ser	
305 310 315 320	
gaa cct ttg ggg atg aaa tca ggg cat ata caa gac tac cag atc act	1008
Glu Pro Leu Gly Met Lys Ser Gly His Ile Gln Asp Tyr Gln Ile Thr	
325 330 335	
gcc tcc agc gtc ttc aga aca ctc aac atg gac atg ttt act tgg gaa	1056
Ala Ser Ser Val Phe Arg Thr Leu Asn Met Asp Met Phe Thr Trp Glu	
340 345 350	
cca agg aaa gcc agg ctg gac aag caa ggc aaa gta aat gcc tgg act	1104
Pro Arg Lys Ala Arg Leu Asp Lys Gln Gly Lys Val Asn Ala Trp Thr	
355 360 365	
tcc ggc cat aac gac cag tca caa tgg tta cag gtt gat ctt ctt gtc	1152
Ser Gly His Asn Asp Gln Ser Gln Trp Leu Gln Val Asp Leu Leu Val	
370 375 380	
cct	1155
Pro	
385	

<210> 12
 <211> 385
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 12

Met Lys His Leu Val Ala Ala Trp Leu Leu Val Gly Leu Ser Leu Gly
1 5 10 15

Val Pro Gln Phe Gly Lys Gly Asp Ile Cys Asn Pro Asn Pro Cys Glu
20 25 30

Asn Gly Gly Ile Cys Leu Ser Gly Leu Ala Asp Asp Ser Phe Ser Cys
35 40 45

Glu Cys Pro Glu Gly Phe Ala Gly Pro Asn Cys Ser Ser Val Val Glu
50 55 60

Val Ala Ser Asp Glu Glu Lys Pro Thr Ser Ala Gly Pro Cys Ile Pro
65 70 75 80

Asn Pro Cys His Asn Gly Gly Thr Cys Glu Ile Ser Glu Ala Tyr Arg
85 90 95

Gly Asp Thr Phe Ile Gly Tyr Val Cys Lys Cys Pro Arg Gly Phe Asn
100 105 110

Gly Ile His Cys Gln His Asn Ile Asn Glu Cys Glu Ala Glu Pro Cys
115 120 125

Arg Asn Gly Gly Ile Cys Thr Asp Leu Val Ala Asn Tyr Ser Cys Glu
130 135 140

Cys Pro Gly Glu Phe Met Gly Arg Asn Cys Gln Tyr Lys Cys Ser Gly
145 150 155 160

Pro Leu Gly Ile Glu Gly Gly Ile Ile Ser Asn Gln Gln Ile Thr Ala
165 170 175

Ser Ser Thr His Arg Ala Leu Phe Gly Leu Arg Lys Trp Tyr Pro Tyr
180 185 190

Tyr Ala Arg Leu Asn Lys Lys Gly Leu Ile Asn Ala Trp Thr Ala Ala
195 200 205

Glu Asn Asp Arg Trp Pro Trp Ile Gln Ile Asn Leu Gln Arg Lys Met
210 215 220

Arg Val Thr Gly Val Ile Thr Gln Gly Ala Lys Arg Ile Gly Ser Pro
225 230 235 240

Glu Tyr Ile Lys Ser Tyr Lys Ile Ala Tyr Ser Asn Asp Gly Lys Thr
245 250 255

Trp Ala Met Tyr Lys Val Lys Gly Thr Asn Glu Glu Met Val Phe Arg
260 265 270

Gly Asn Val Asp Asn Asn Thr Pro Tyr Ala Asn Ser Phe Thr Pro Pro
275 280 285

Ile Lys Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr Pro Gln Ile Cys Arg Arg His
290 295 300

Cys Thr Leu Arg Met Glu Leu Leu Gly Cys Glu Leu Ser Gly Cys Ser
305 310 315 320

Glu Pro Leu Gly Met Lys Ser Gly His Ile Gln Asp Tyr Gln Ile Thr
325 330 335

Ala Ser Ser Val Phe Arg Thr Leu Asn Met Asp Met Phe Thr Trp Glu
 340 345 350

Pro Arg Lys Ala Arg Leu Asp Lys Gln Gly Lys Val Asn Ala Trp Thr
 355 360 365

Ser Gly His Asn Asp Gln Ser Gln Trp Leu Gln Val Asp Leu Leu Val
 370 375 380

Pro
 385

<210> 13
 <211> 789
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (789)

<400> 13
 ata aat ttg caa aga aaa atg aga gtc act ggt gtt att acc caa gga 48
 Ile Asn Leu Gln Arg Lys Met Arg Val Thr Gly Val Ile Thr Gln Gly
 1 5 10 15
 gca aaa agg att gga agc cca gag tac ata aaa tcc tac aaa att gcc 96
 Ala Lys Arg Ile Gly Ser Pro Glu Tyr Ile Lys Ser Tyr Lys Ile Ala
 20 25 30
 tac agc aat gac ggg aag acc tgg gca atg tac aaa gta aaa ggc acc 144
 Tyr Ser Asn Asp Gly Lys Thr Trp Ala Met Tyr Lys Val Lys Gly Thr
 35 40 45

aat gaa gag atg gtc ttt cgt gga aat gtt gat aac aac aca cca tat	192
Asn Glu Glu Met Val Phe Arg Gly Asn Val Asp Asn Asn Thr Pro Tyr	
50 55 60	
 gct aat tct ttc aca ccc cca atc aaa gct cag tat gta aga ctc tac	 240
Ala Asn Ser Phe Thr Pro Pro Ile Lys Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr	
65 70 75 80	
 ccc caa att tgt cga agg cat tgt act tta aga atg gaa ctt ctt ggc	 288
Pro Gln Ile Cys Arg Arg His Cys Thr Leu Arg Met Glu Leu Leu Gly	
85 90 95	
 tgt gag ctc tca ggc tgt tca gaa cct ttg ggg atg aaa tca ggg cat	 336
Cys Glu Leu Ser Gly Cys Ser Glu Pro Leu Gly Met Lys Ser Gly His	
100 105 110	
 ata caa gac tac cag atc act gcc tcc agc gtc ttc aga aca ctc aac	 384
Ile Gln Asp Tyr Gln Ile Thr Ala Ser Ser Val Phe Arg Thr Leu Asn	
115 120 125	
 atg gac atg ttt act tgg gaa cca agg aaa gcc agg ctg gac aag caa	 432
Met Asp Met Phe Thr Trp Glu Pro Arg Lys Ala Arg Leu Asp Lys Gln	
130 135 140	
 ggc aaa gta aat gcc tgg act tcc ggc cat aac gac cag tca caa tgg	 480
Gly Lys Val Asn Ala Trp Thr Ser Gly His Asn Asp Gln Ser Gln Trp	
145 150 155 160	
 tta cag gtt gat ctt ctt gtc cct act aag gtg aca ggc atc att aca	 528
Leu Gln Val Asp Leu Leu Val Pro Thr Lys Val Thr Gly Ile Ile Thr	
165 170 175	
 caa gga gct aaa gat ttt ggt cac gtg cag ttt gtt ggg tca tac aaa	 576
Gln Gly Ala Lys Asp Phe Gly His Val Gln Phe Val Gly Ser Tyr Lys	
180 185 190	
 cta gct tac agc aat gat gga gaa cac tgg atg gtg cac cag gat gaa	 624
Leu Ala Tyr Ser Asn Asp Gly Glu His Trp Met Val His Gln Asp Glu	
195 200 205	

aaa cag agg aaa gac aag gtt ttt caa ggc aat ttt gac aat gac act 672
 Lys Gln Arg Lys Asp Lys Val Phe Gln Gly Asn Phe Asp Asn Asp Thr
 210 215 220

cac agg aaa aat gtc atc gac cct ccc atc tat gca cga ttc ata aga 720
 His Arg Lys Asn Val Ile Asp Pro Pro Ile Tyr Ala Arg Phe Ile Arg
 225 230 235 240

atc ctt cct tgg tcc tgg tat gga agg atc act ctg cgg tca gag ctg 768
 Ile Leu Pro Trp Ser Trp Tyr Gly Arg Ile Thr Leu Arg Ser Glu Leu
 245 250 255

ctg ggc tgc gca gag gag gaa 789
 Leu Gly Cys Ala Glu Glu Glu
 260

<210> 14
 <211> 263
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 14

Ile Asn Leu Gln Arg Lys Met Arg Val Thr Gly Val Ile Thr Gln Gly
 1 5 10 15

Ala Lys Arg Ile Gly Ser Pro Glu Tyr Ile Lys Ser Tyr Lys Ile Ala
 20 25 30

Tyr Ser Asn Asp Gly Lys Thr Trp Ala Met Tyr Lys Val Lys Gly Thr
 35 40 45

Asn Glu Glu Met Val Phe Arg Gly Asn Val Asp Asn Asn Thr Pro Tyr
 50 55 60

Ala Asn Ser Phe Thr Pro Pro Ile Lys Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr
65 70 75 80

Pro Gln Ile Cys Arg Arg His Cys Thr Leu Arg Met Glu Leu Leu Gly
85 90 95

Cys Glu Leu Ser Gly Cys Ser Glu Pro Leu Gly Met Lys Ser Gly His
100 105 110

Ile Gln Asp Tyr Gln Ile Thr Ala Ser Ser Val Phe Arg Thr Leu Asn
115 120 125

Met Asp Met Phe Thr Trp Glu Pro Arg Lys Ala Arg Leu Asp Lys Gln
130 135 140

Gly Lys Val Asn Ala Trp Thr Ser Gly His Asn Asp Gln Ser Gln Trp
145 150 155 160

Leu Gln Val Asp Leu Leu Val Pro Thr Lys Val Thr Gly Ile Ile Thr
165 170 175

Gln Gly Ala Lys Asp Phe Gly His Val Gln Phe Val Gly Ser Tyr Lys
180 185 190

Leu Ala Tyr Ser Asn Asp Gly Glu His Trp Met Val His Gln Asp Glu
195 200 205

Lys Gln Arg Lys Asp Lys Val Phe Gln Gly Asn Phe Asp Asn Asp Thr
210 215 220

His Arg Lys Asn Val Ile Asp Pro Pro Ile Tyr Ala Arg Phe Ile Arg
 225 230 235 240

Ile Leu Pro Trp Ser Trp Tyr Gly Arg Ile Thr Leu Arg Ser Glu Leu
 245 250 255

Leu Gly Cys Ala Glu Glu Glu
 260

<210> 15
 <211> 306
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (306)

<400> 15
 ata aat ttg caa aga aaa atg aga gtc act ggt gtt att acc caa gga 48
 Ile Asn Leu Gln Arg Lys Met Arg Val Thr Gly Val Ile Thr Gln Gly
 1 5 10 15
 gca aaa agg att gga agc cca gag tac ata aaa tcc tac aaa att gcc 96
 Ala Lys Arg Ile Gly Ser Pro Glu Tyr Ile Lys Ser Tyr Lys Ile Ala
 20 25 30
 tac agc aat gac ggg aag acc tgg gca atg tac aaa gta aaa ggc acc 144
 Tyr Ser Asn Asp Gly Lys Thr Trp Ala Met Tyr Lys Val Lys Gly Thr
 35 40 45
 aat gaa gag atg gtc ttt cgt gga aat gtt gat aac aac aca cca tat 192
 Asn Glu Glu Met Val Phe Arg Gly Asn Val Asp Asn Asn Thr Pro Tyr
 50 55 60
 gct aat tct ttc aca ccc cca atc aaa gct cag tat gta aga ctc tac 240

Ala Asn Ser Phe Thr Pro Pro Ile Lys Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr
 65 70 75 80

ccc caa att tgt cga agg cat tgt act tta aga atg gaa ctt ctt ggc 288
 Pro Gln Ile Cys Arg Arg His Cys Thr Leu Arg Met Glu Leu Leu Gly
 85 90 95

tgt gag ctc tca ggc tgt 306
 Cys Glu Leu Ser Gly Cys
 100

<210> 16
 <211> 102
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 16

Ile Asn Leu Gln Arg Lys Met Arg Val Thr Gly Val Ile Thr Gln Gly
 1 5 10 15

Ala Lys Arg Ile Gly Ser Pro Glu Tyr Ile Lys Ser Tyr Lys Ile Ala
 20 25 30

Tyr Ser Asn Asp Gly Lys Thr Trp Ala Met Tyr Lys Val Lys Gly Thr
 35 40 45

Asn Glu Glu Met Val Phe Arg Gly Asn Val Asp Asn Asn Thr Pro Tyr
 50 55 60

Ala Asn Ser Phe Thr Pro Pro Ile Lys Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr
 65 70 75 80

Pro Gln Ile Cys Arg Arg His Cys Thr Leu Arg Met Glu Leu Leu Gly

85

90

95

Cys Glu Leu Ser Gly Cys
100

<210> 17

678 <211>

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

$\langle 221 \rangle$ CDS

<222> (1) .. (678)

<400> 17

tgt gaa gct gag cct tgc aga aat ggc gga ata tgt acc gac ctt gtt 48
 Cys Glu Ala Glu Pro Cys Arg Asn Gly Gly Ile Cys Thr Asp Leu Val
 1 5 10 15

gct aac tac tct tgt gaa tgc cca gga gaa ttt atg gga cga aat tgt 96
Ala Asn Tyr Ser Cys Glu Cys Pro Gly Glu Phe Met Gly Arg Asn Cys
20 25 30

caa tat aaa tgc tct ggg cca ttg gga atc gaa ggt ggg atc ata tct 144
Gln Tyr Lys Cys Ser Gly Pro Leu Gly Ile Glu Gly Gly Ile Ile Ser
35 40 45

aat cag caa atc aca gct tca tct act cac cga gct ctt ttt gga ctc 192
Asn Gln Gln Ile Thr Ala Ser Ser Thr His Arg Ala Leu Phe Gly Leu
50 55 60

cgg aag tgg tat ccc tac tat gct cga ctt aat aag aag ggc ctt ata 240
Arg Lys Trp Tyr Pro Tyr Tyr Ala Arg Leu Asn Lys Lys Gly Leu Ile
65 70 75 80

aat gcc tgg aca gct gct gaa aat gac aga tgg cca tgg att cag ata 288
Asn Ala Trp Thr Ala Ala Glu Asn Asp Arg Trp Pro Trp Ile Gln Ile

85	90	95	
aat ttg caa aga aaa atg aga gtc act ggt gtt att acc caa gga gca			336
Asn Leu Gln Arg Lys Met Arg Val Thr Gly Val Ile Thr Gln Gly Ala			
100	105	110	
aaa agg att gga agc cca gag tac ata aaa tcc tac aaa att gcc tac			384
Lys Arg Ile Gly Ser Pro Glu Tyr Ile Lys Ser Tyr Lys Ile Ala Tyr			
115	120	125	
agc aat gac ggg aag acc tgg gca atg tac aaa gta aaa ggc acc aat			432
Ser Asn Asp Gly Lys Thr Trp Ala Met Tyr Lys Val Lys Gly Thr Asn			
130	135	140	
gaa gag atg gtc ttt cgt gga aat gtt gat aac aac aca cca tat gct			480
Glu Glu Met Val Phe Arg Gly Asn Val Asp Asn Asn Thr Pro Tyr Ala			
145	150	155	160
aat tct ttc aca ccc cca atc aaa gct cag tat gta aga ctc tac ccc			528
Asn Ser Phe Thr Pro Pro Ile Lys Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr Pro			
165	170	175	
caa att tgt cga agg cat tgt act tta aga atg gaa ctt ctt ggc tgt			576
Gln Ile Cys Arg Arg His Cys Thr Leu Arg Met Glu Leu Leu Gly Cys			
180	185	190	
gag ctc tca ggc tgt tca gaa cct ttg ggg atg aaa tca ggg cat ata			624
Glu Leu Ser Gly Cys Ser Glu Pro Leu Gly Met Lys Ser Gly His Ile			
195	200	205	
caa gac tac cag atc act gcc tcc agc gtc ttc aga aca ctc aac atg			672
Gln Asp Tyr Gln Ile Thr Ala Ser Ser Val Phe Arg Thr Leu Asn Met			
210	215	220	
gac atg			678
Asp Met			
225			

<210> 18

<211> . 226

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Cys Glu Ala Glu Pro Cys Arg Asn Gly Gly Ile Cys Thr Asp Leu Val
1 5 10 15

Ala Asn Tyr Ser Cys Glu Cys Pro Gly Glu Phe Met Gly Arg Asn Cys
20 25 30

Gln Tyr Lys Cys Ser Gly Pro Leu Gly Ile Glu Gly Gly Ile Ile Ser
35 40 45

Asn Gln Gln Ile Thr Ala Ser Ser Thr His Arg Ala Leu Phe Gly Leu
50 55 60

Arg Lys Trp Tyr Pro Tyr Tyr Ala Arg Leu Asn Lys Lys Gly Leu Ile
65 70 75 80

Asn Ala Trp Thr Ala Ala Glu Asn Asp Arg Trp Pro Trp Ile Gln Ile
85 90 95

Asn Leu Gln Arg Lys Met Arg Val Thr Gly Val Ile Thr Gln Gly Ala
100 105 110

Lys Arg Ile Gly Ser Pro Glu Tyr Ile Lys Ser Tyr Lys Ile Ala Tyr
115 120 125

Ser Asn Asp Gly Lys Thr Trp Ala Met Tyr Lys Val Lys Gly Thr Asn
130 135 140

Glu Glu Met Val Phe Arg Gly Asn Val Asp Asn Asn Thr Pro Tyr Ala
 145 150 155 160

Asn Ser Phe Thr Pro Pro Ile Lys Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr Pro
 165 170 175

Gln Ile Cys Arg Arg His Cys Thr Leu Arg Met Glu Leu Leu Gly Cys
 180 185 190

Glu Leu Ser Gly Cys Ser Glu Pro Leu Gly Met Lys Ser Gly His Ile
 195 200 205

Gln Asp Tyr Gln Ile Thr Ala Ser Ser Val Phe Arg Thr Leu Asn Met
 210 215 220

Asp Met
 225

<210> 19
 <211> 285
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (285)

<400> 19
 tgt gaa gct gag cct tgc aga aat ggc gga ata tgt acc gac ctt gtt 48
 Cys Glu Ala Glu Pro Cys Arg Asn Gly Gly Ile Cys Thr Asp Leu Val
 1 5 10 15

gct aac tac tct tgt gaa tgc cca gga gaa ttt atg gga cga aat tgt 96
 Ala Asn Tyr Ser Cys Glu Cys Pro Gly Glu Phe Met Gly Arg Asn Cys
 20 25 30

caa tat aaa tgc tct ggg cca ttg gga atc gaa ggt ggg atc ata tct 144
 Gln Tyr Lys Cys Ser Gly Pro Leu Gly Ile Glu Gly Gly Ile Ile Ser
 35 40 45

aat cag caa atc aca gct tca tct act cac cga gct ctt ttt gga ctc 192
 Asn Gln Gln Ile Thr Ala Ser Ser Thr His Arg Ala Leu Phe Gly Leu
 50 55 60

cgg aag tgg tat ccc tac tat gct cga ctt aat aag aag ggc ctt ata 240
 Arg Lys Trp Tyr Pro Tyr Tyr Ala Arg Leu Asn Lys Lys Gly Leu Ile
 65 70 75 80

aat gcc tgg aca gct gct gaa aat gac aga tgg cca tgg att cag 285
 Asn Ala Trp Thr Ala Ala Glu Asn Asp Arg Trp Pro Trp Ile Gln
 85 90 95

<210> 20
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 20

Cys Glu Ala Glu Pro Cys Arg Asn Gly Gly Ile Cys Thr Asp Leu Val
 1 5 10 15

Ala Asn Tyr Ser Cys Glu Cys Pro Gly Glu Phe Met Gly Arg Asn Cys
 20 25 30

Gln Tyr Lys Cys Ser Gly Pro Leu Gly Ile Glu Gly Gly Ile Ile Ser
 35 40 45

Asn Gln Gln Ile Thr Ala Ser Ser Thr His Arg Ala Leu Phe Gly Leu
 50 55 60

Arg Lys Trp Tyr Pro Tyr Tyr Ala Arg Leu Asn Lys Lys Gly Leu Ile
 65 70 75 80

Asn Ala Trp Thr Ala Ala Glu Asn Asp Arg Trp Pro Trp Ile Gln
 85 90 95

<210> 21
 <211> 396
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (396)

<400> 21
 ttt act tgg gaa cca agg aaa gcc agg ctg gac aag caa ggc aaa gta 48
 Phe Thr Trp Glu Pro Arg Lys Ala Arg Leu Asp Lys Gln Gly Lys Val
 1 5 10 15
 aat gcc tgg act tcc ggc cat aac gac cag tca caa tgg tta cag gtt 96
 Asn Ala Trp Thr Ser Gly His Asn Asp Gln Ser Gln Trp Leu Gln Val
 20 25 30
 gat ctt ctt gtc cct act aag gtg aca ggc atc att aca caa gga gct 144
 Asp Leu Leu Val Pro Thr Lys Val Thr Gly Ile Ile Thr Gln Gly Ala
 35 40 45
 aaa gat ttt ggt cac gtg cag ttt gtt ggg tca tac aaa cta gct tac 192
 Lys Asp Phe Gly His Val Gln Phe Val Gly Ser Tyr Lys Leu Ala Tyr
 50 55 60

agc aat gat gga gaa cac tgg atg gtg cac cag gat gaa aaa cag agg 240
 Ser Asn Asp Gly Glu His Trp Met Val His Gln Asp Glu Lys Gln Arg
 65 70 75 80

aaa gac aag gtt ttt caa ggc aat ttt gac aat gac act cac agg aaa 288
 Lys Asp Lys Val Phe Gln Gly Asn Phe Asp Asn Asp Thr His Arg Lys
 85 90 95

aat gtc atc gac cct ccc atc tat gca cga ttc ata aga atc ctt cct 336
 Asn Val Ile Asp Pro Pro Ile Tyr Ala Arg Phe Ile Arg Ile Leu Pro
 100 105 110

tgg tcc tgg tat gga agg atc act ctg cgg tca gag ctg ctg ggc tgc 384
 Trp Ser Trp Tyr Gly Arg Ile Thr Leu Arg Ser Glu Leu Leu Gly Cys
 115 120 125

gca gag gag gaa 396
 Ala Glu Glu Glu
 130

<210> 22

<211> 132

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Phe Thr Trp Glu Pro Arg Lys Ala Arg Leu Asp Lys Gln Gly Lys Val
 1 5 10 15

Asn Ala Trp Thr Ser Gly His Asn Asp Gln Ser Gln Trp Leu Gln Val
 20 25 30

Asp Leu Leu Val Pro Thr Lys Val Thr Gly Ile Ile Thr Gln Gly Ala
 35 40 45

Lys Asp Phe Gly His Val Gln Phe Val Gly Ser Tyr Lys Leu Ala Tyr
 50 55 60

Ser Asn Asp Gly Glu His Trp Met Val His Gln Asp Glu Lys Gln Arg
 65 70 75 80

Lys Asp Lys Val Phe Gln Gly Asn Phe Asp Asn Asp Thr His Arg Lys
 85 90 95

Asn Val Ile Asp Pro Pro Ile Tyr Ala Arg Phe Ile Arg Ile Leu Pro
 100 105 110

Trp Ser Trp Tyr Gly Arg Ile Thr Leu Arg Ser Glu Leu Leu Gly Cys
 115 120 125

Ala Glu Glu Glu
 130

<210> 23
 <211> 678
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1).. (678)

<400> 23
 tgc gaa gtt gag cct tgc aaa aat ggt gga ata tgt aca gat ctt gtt 48
 Cys Glu Val Glu Pro Cys Lys Asn Gly Gly Ile Cys Thr Asp Leu Val
 1 5 10 15

gct aac tat tcc tgt gag tgc cca ggc gaa ttt atg gga aga aat tgt 96

Ala Asn Tyr Ser Cys Glu Cys Pro Gly Glu Phe Met Gly Arg Asn Cys	
20 25 30	
caa tac aaa tgc tca ggc cca ctg gga att gaa ggt gga att ata tca	144
Gln Tyr Lys Cys Ser Gly Pro Leu Gly Ile Glu Gly Gly Ile Ile Ser	
35 40 45	
aac cag caa atc aca gct tcc tct act cac cga gct ctt ttt gga ctc	192
Asn Gln Gln Ile Thr Ala Ser Ser Thr His Arg Ala Leu Phe Gly Leu	
50 55 60	
caa aaa tgg tat ccc tac tat gca cgt ctt aat aag aag ggg ctt ata	240
Gln Lys Trp Tyr Pro Tyr Tyr Ala Arg Leu Asn Lys Lys Gly Leu Ile	
65 70 75 80	
aat gcg tgg aca gct gca gaa aat gac aga tgg ccg tgg att cag ata	288
Asn Ala Trp Thr Ala Ala Glu Asn Asp Arg Trp Pro Trp Ile Gln Ile	
85 90 95	
aat ttg caa agg aaa atg aga gtt act ggt gtg att acc caa gga gcc	336
Asn Leu Gln Arg Lys Met Arg Val Thr Gly Val Ile Thr Gln Gly Ala	
100 105 110	
aag agg att gga agc cca gag tat ata aaa tcc tac aaa att gcc tac	384
Lys Arg Ile Gly Ser Pro Glu Tyr Ile Lys Ser Tyr Lys Ile Ala Tyr	
115 120 125	
agt aat gat gga aag act tgg gca atg tac aaa gtg aaa ggc acc aat	432
Ser Asn Asp Gly Lys Thr Trp Ala Met Tyr Lys Val Lys Gly Thr Asn	
130 135 140	
gaa gac atg gtg ttt cgt gga aac att gat aac aac act cca tat gct	480
Glu Asp Met Val Phe Arg Gly Asn Ile Asp Asn Asn Thr Pro Tyr Ala	
145 150 155 160	
aac tct ttc aca ccc ccc ata aaa gct cag tat gta aga ctc tat ccc	528
Asn Ser Phe Thr Pro Pro Ile Lys Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr Pro	
165 170 175	
caa gtt tgt cga aga cat tgc act ttg cga atg gaa ctt ctt ggc tgt	576

Gln Val Cys Arg Arg His Cys Thr Leu Arg Met Glu Leu Leu Gly Cys
 180 185 190

gaa ctg tcg ggt tgt tct gag cct ctg ggt atg aaa tca gga cat ata 624
 Glu Leu Ser Gly Cys Ser Glu Pro Leu Gly Met Lys Ser Gly His Ile
 195 200 205

caa gac tat cag atc act gcc tcc agc atc ttc aga acg ctc aac atg 672
 Gln Asp Tyr Gln Ile Thr Ala Ser Ser Ile Phe Arg Thr Leu Asn Met
 210 215 220

gac atg 678
 Asp Met
 225

<210> 24
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Cys Glu Val Glu Pro Cys Lys Asn Gly Gly Ile Cys Thr Asp Leu Val
 1 5 10 15

Ala Asn Tyr Ser Cys Glu Cys Pro Gly Glu Phe Met Gly Arg Asn Cys
 20 25 30

Gln Tyr Lys Cys Ser Gly Pro Leu Gly Ile Glu Gly Gly Ile Ile Ser
 35 40 45

Asn Gln Gln Ile Thr Ala Ser Ser Thr His Arg Ala Leu Phe Gly Leu
 50 55 60

Gln Lys Trp Tyr Pro Tyr Tyr Ala Arg Leu Asn Lys Lys Gly Leu Ile

Asp Met

225

<210> 25

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 25

aaagatctaa cccgaacccc tgtgaa

26

<210> 26

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 26

aactcgagca tttgtggatg tgcg

24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009616

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/47, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C07K19/00, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/47, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C07K19/00, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus(JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 11-507527 A (Progenitor, Inc.), 06 July, 1999 (06.07.99), Fig. 6 & WO 96/40769 A1 & US 5874562 A	1-27
X	WO 02/36826 A2 (Gene Logic, Inc.), 10 May, 2002 (10.05.02), Seq. Nos. 1 to 2 (Family: none)	1-27

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 August, 2004 (16.08.04)

Date of mailing of the international search report
31 August, 2004 (31.08.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/009616

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N15/12, C07K14/47, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C07K19/00, C12P21/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N15/12, C07K14/47, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C07K19/00, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus (JOIS) SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 11-507527 A (プロジェニター, インコーポレーテッド) 1999.07.06, Fig.6 & WO 96/40769 A1 & US 5874562 A	1-27
X	WO 02/36826 A2 (Gene Logic, Inc.) 2002.05.10, seq.1-2 ファミリーなし	1-27

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16.08.2004

国際調査報告の発送日

31.8.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4N

3126

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第I欄 ニクレオチド又はアミノ酸配列 (第1ページの1. bの続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。
- a. タイプ ☒ 配列表
☐ 配列表に関連するテーブル
- b. フォーマット ☐ 書面
☒ コンピュータ読み取り可能な形式
- c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる
☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された
☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された
2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見：